

Ministry of Science & Technology
Spanish Patent and Trademark Office

Application form

Application number: P200202911

Date and hour of filing before the SPTO: 18 December 2002 11:25

Date and hour of filing in a place other than the SPTO:

(1) Modality:

☒ Patent of Invention

☐ Utility Model

(2) Type of application

☐ Patent of addition

☐ Divisional application

☐ Change of modality

☐ Transformation of an European patent application

☐ PCT: Entry into national phase

(3) Main or origin filing:

Modality

Application number

Filing date

(4) Place of filing: Madrid

Area code: 28

(5) Applicant(s): Surnames or social denomination/Name/Nationality/Country
code/INC/CIF/CNAE/PYME

Fundación para la Investigación Médica Aplicada/Spanish/ES/G82198524/73

(6) Data of the first applicant

Address: Pintor Paret 5, 1ºF

City: Pamplona

Province: Navarra

Residence country: Spain

Country code: ES

Nationality: Spanish

Country code: ES

Telephone: 948 425 600

Telefax: 948 425 715

E-mail: ferrasti@unav.es

Area code: 31008

(7) Inventor(s): Surnames/Names/Nationality/Country code

1. Mato de la Paz, José María; Spanish; ES

2. Corrales Izquierdo, Fernando; Spanish; ES

3. Santamaría Martínez, Enrique; Spanish; ES

(8) ☐ The applicant is the inventor

☒ The applicant is not the inventor or single inventor

(9) Mode of acquisition of the right
() working invention; () contract; () (succession)

(10) Title of the invention:

Method for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) by means of molecular markers.

(11) Deposit of biological material: (): Yes (x): No

(12) Official exhibitions

(13) Priority declarations: Origin country/country code/Number/Date

(14) Applicant requests an extension for payment of fees according to Art. 162, Ley 11/1986 de Patentes (Patent Law)

(15) Agent/Representative: Complete name and postal address (if Official Agent, name and code) (Fill in only by professionals)

(16) List of accompanying documents:

- | | |
|--|--------------------------------------|
| (x) Description, number of pages: 23 | () Power of Attorney |
| (x) Number of claims: 14 | (x) Receipt of payment of filing fee |
| (x) Drawings, number of pages: 5 | () Complementary information page |
| () Sequence listing, number of pages: | () Proofs of drawings |
| () Priority document | () Others |
| () Priority document translation | |

Signature of the Applicant or Representative (There is a signature) (see communication)

Officer's signature (There is a signature)

Notice on the grant fee: It is notified that this application will be considered withdrawn if payment of grant fee is not effected; in order to pay said fee there are three months from the mention of grant in the Official Journal, plus the ten days established by Art. 81 RD 2245/1986

Head of the Spanish Patent and Trademark Office (SPTO)
informacion@oepm.es
www.oepm.es

Ministry of Science & Technology
Spanish Patent and Trademark Office

Application Number: P200202911
Filing date:

ABSTRACT AND DRAWING

ABSTRACT (Max. 150 words)

METHOD FOR THE DIAGNOSIS OF NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS (NASH) BY MEANS OF MOLECULAR MARKERS

The *in vitro* method for diagnosing non-alcoholic steatohepatitis (NASH) comprises detecting and quantifying in a liver tissue sample the levels of a protein which can be used as a NASH molecular marker and which is selected from apolipoprotein A1, mitochondrial ATPase β subunit, leukotriene A4 hydrolase, keratin 18, guanidinoacetate N-methyltransferase, superoxide dismutase, albumin, antioxidant protein 2 (isoforms 1 and 2), prohibitin 1, methionine adenosyl transferase, long-chain acyl-CoA dehydrogenase, selenium binding protein, and their combinations; and comparing the results obtained with normal reference values of said proteins in healthy liver tissue. Said method can be used to diagnose NASH and/or to assess a patient's potential risk of developing NASH.

DRAWING

Ministry of Science & Technology
Spanish Patent and Trademark Office

(12) Application for Patent of Invention
(21) Application Number: P200202911
(22) Filing date:
(62) Patent from which it is a divisional

Priority data
(31) Number
(32) Date
(33) Country

(71) Applicant(s)
Fundación para la Investigación Médica Aplicada
Address: c/ Pintor Paret 5, 1ºF, E-31008 Pamplona (Spain)
Citizenship: Spanish

(72) Inventor(s)
José María Mato de la Paz
Fernando Corrales Izquierdo
Enrique Santamaría Martínez

(51) Int. Cl.
(54) Title: Method for the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH) by means of molecular markers

Drawing (only for construing the abstract)

(57) Abstract (voluntary, no legal value)

METHOD FOR THE DIAGNOSIS OF NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS (NASH) BY MEANS OF MOLECULAR MARKERS

The *in vitro* method for diagnosing non-alcoholic steatohepatitis (NASH) comprises detecting and quantifying in a liver tissue sample the levels of a protein which can be used as a NASH molecular marker and which is selected from apolipoprotein A1, mitochondrial ATPase β subunit, leukotriene A4 hydrolase, keratin 18, guanidinoacetate N-methyltransferase, superoxide dismutase, albumin, antioxidant protein 2 (isoforms 1 and 2), prohibitin 1, methionine adenosyl transferase, long-chain acyl-CoA dehydrogenase, selenium binding protein, and their combinations; and comparing the results obtained with normal reference values of said proteins in healthy liver tissue. Said method can be used to diagnose NASH and/or to assess a patient's potential risk of developing NASH.

METHOD FOR THE DIAGNOSIS OF NON-ALCOHOLIC STEATOHEPATITIS (NASH) BY MEANS OF MOLECULAR MARKERS

FIELD OF THE INVENTION

5 In general, the invention is related to the diagnosis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH), more specifically, to the early diagnosis for the susceptibility of a person to develop NASH or its confirmation in already diagnosed patients: in both cases the diagnosis is based on the identification of molecular markers of NASH and/or the analysis of the expression patterns of said molecular markers of NASH in liver.

10

BACKGROUND OF THE INVENTION

Non-alcoholic steatohepatitis (NASH) is a severe liver lesion that is characterized by necrosis, inflammation and fibrosis. NASH and alcoholic steatohepatitis (ASH) are histologically indistinguishable and are thought to have the same etiology. Nowadays,
15 NASH is considered to be a progressive disease with 25% incidence of cirrhosis and 10%-15% incidence of mortality. It is also believed to cause liver disease in most cases of cryptogenic cirrhosis (unknown cause). Therefore, research on NASH has become one of the subjects with top priority in clinical hepatology. NASH epidemiology, characteristics, diagnosis strategies and treatment have been reviewed by Andrea E. Reid
20 [Reid A.E., Gastroenterology, 2001, 121:710-723].

To illustrate the problem, some epidemiological data could be enumerated:

- between 7% and 11% of the patients who undergo an liver biopsy in the United States and Canada are diagnosed with NASH;
- between 60% and 83% of the patients diagnosed with NASH are women;
- 25 – by 30% of the obese patients suffer from NASH;
- fibrosis appearance is detected in 43% of patients with NASH;
- cirrhosis incidence in patients with NASH is approximately 25%;
- all the patients who develop alcoholic cirrhosis (approximately 50% out of all cirrhosis cases) have previously developed ASH; and
- 30 – NASH is frequent in patients with hepatitis C.

Due to the prominent position of NASH among chronic and progressive liver diseases, there is an increasing interest in the determination of its pathogenesis.

However, pathophysiological mechanisms leading to NASH development have not been determined yet. Alcoholic people may have a moderately fatty liver for many years and, without a change in their drinking habits, suddenly develop severe alcoholic hepatitis. In the same way, obesity, type II diabetes and hypertriglyceridemia are frequently associated with fat accumulation in liver and, although this situation does not invariably lead to the development of necroinflammatory lesions, these patients are at higher risk to develop NASH. Consequently, the existence of environmental or cellular factors working as inhibitors of a cascade of molecular events inducing necrosis, inflammation and fibrosis have been proposed. Portal endotoxemia and lipid peroxidation are two of these possible factors. Alterations in the expression of different genes/proteins, such as CYP2E1, CYP4A, UCP2, have also been identified in NASH and ASH; however, none of these genes have a value for the diagnosis or prediction of the development of the disease in time.

Nowadays, most NASH patients are examined due to high, chronic results in liver function analysis (e.g., moderate chronic increase of aminotransferases), hepatomegalya, or both. A combination of the clinical history, physical examination, blood analysis and radiological and histological examinations exclude other causes of liver disease. Blood analysis has to include a complete liver profile including, for example, blood cell count and anti-HCV antibodies, hepatitis B surface antigen, hepatic iron index, ceruloplasmin, antinuclear antibody, α_1 -antitrypsin and anti-mitochondrial antibody determination. Image diagnosis, for example with liver ultrasonography (the preferred modality of image diagnosis), reveals the existence of a "shiny" liver with increased ecogenity. Nevertheless, this technique sensitivity and specificity for steatosis are 89%-95% and 84-93% respectively. Fatty liver diagnosis can also be diagnosed by computerized tomography or by abdominal magnetic resonance. In any case, clinical, analytical and radiological data do not allow the differentiation of NASH and alcoholic hepatitis given that both pathologies are histologically identical (presence of diffuse or centrilobular macrovesicular steatosis, ballooned hepatocytes, necrosis, mixed lobular inflammatory infiltration, with or without necrosis, Mallory bodies, lipogranulomes and glycogenic nuclei). Therefore, the diagnosis of NASH is only confirmed in the cases of significant alcohol intake absence (typically lower than 20-40 g alcohol/day). Up to now, the proposed molecular markers (CYP2E1, CYP4A, UCP2) do not have a value for the diagnosis or prediction of the development of the disease in time.

Therefore, it is necessary to have tools to study NASH progression in time and to identify molecular markers associated with NASH. One of these tools could be an animal model which allowed the analysis of the patterns of genes and proteins in a normal liver and in a liver with NASH, as well as along the disease progression in time.

5 Identification of these molecular markers, particularly early molecular markers, with a diagnosis and predictive value for NASH, and the study of their functional effects, would help prevent and/or treat NASH. Their identification would also help search and develop useful drugs for preventive and/or curative treatment of this disease. A good molecular marker of NASH would appear early in the liver, long before histological

10 alterations were observed. Ideally, to efficiently diagnose the predisposition to suffer from NASH, it would be better to have a group of early molecular markers of NASH appearance than to have only one. These group of molecular markers would be something like the early “fingerprint” of the disease.

In this research line, a model for the *in vivo* study of NASH has been developed.

15 This model is based on a knockout mouse deficient in *MAT1A* gene, that is, in S-adenosylmethionine (AdoMet) synthesis in liver, an essential cellular metabolite, named MATO (Lu S.C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001; 98:5560-5565). In addition to NASH, this MATO mice spontaneously develop oxidative stress and hepatocellular carcinoma (Martínez-Chantar M.L., et al., Faseb J., 2002, 16:1292-1294). *MAT1A* gene

20 is specifically expressed in adult livers, although it has been demonstrated that the expression of this gene is silent in patients with hepatic cirrhosis (both alcoholic and non-alcoholic). 3-month-old MATO mice livers are normal but they are much more liable to develop severe macrovesicular steatosis (induced by a choline-deficient diet) and necrosis (induced by CCl₄); at 8 months, MATO mice spontaneously develop NASH;

25 and at 14-18 months they are at high risk to develop hepatocellular carcinoma (more than 80% of the animals develop hepatic tumours). Preliminary DNA microarray assays (Lu S.C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001; 98:5560-5565) show that at 3 months of age (when the histology of the liver is still normal), there are already hundreds of differences in gene and protein expression between normal or wild type (WT) and

30 MATO mice. That is to say that long before an histological lesion is observed in the liver, NASH has already started to develop at a molecular level, although many of said differences do not remain throughout the progression of the disease.

SUMMARY OF THE INVENTION

One purpose of this invention is the development of a method for the diagnosis of NASH based on the analysis of the expression patterns of certain proteins which work as molecular markers of said disease in liver.

5 To identify NASH molecular markers and obtain the fingerprint of said disease, the inventors have analyzed the differential expression of proteins by means of proteomic techniques (two-dimensional electrophoresis and identification of the differentially expressed proteins by mass spectrometry) in liver samples from WT and MATO mice [mutant knockout mice deficient in *MAT1A* gene (*MAT^{-/-}*)] (Lu S.C., et al.,
10 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001; 98:5560-5565) in time (1 and 15 days, 3 and 8 months old) until the appearance of NASH. Said MATO mutant mice were chosen because they could be used to study the presence of NASH molecular markers before the disease was evident at a histological level.

All mice were fed a normal diet. NASH appearance and evolution was followed
15 up by histological control. The analysis of this information allowed the identification of proteins whose expression is altered (up- or down-regulated) from the first day after the birth of a subject susceptible of developing NASH until NASH appearance. These proteins, useful as NASH molecular markers, are the following: apolipoprotein A1, mitochondrial ATPase β subunit, leukotriene A₄ hydrolase, keratin 18, guanidinoacetate
20 N-methyltransferase, superoxide dismutase, albumin, antioxidant protein 2 (isoform 1), prohibitin 1, methionine adenosyl transferase, long-chain acyl-CoA dehydrogenase, selenium binding protein and antioxidant protein 2 (isoform 2). Apolipoprotein A1, mitochondrial ATPase β subunit, leukotriene A₄ hydrolase, keratin 18, guanidinoacetate
25 N-methyltransferase, superoxide dismutase, albumin and antioxidant protein 2 (isoform 1) are up-regulated in the liver while prohibitin 1, methionine adenosyl transferase, long-chain acyl-CoA dehydrogenase, selenium union protein and antioxidant protein 2 (isoform 2) are down-regulated, months before the appearance of NASH in MATO mice livers. These proteins might be used as molecular markers of the risk of development of NASH, isolated or combined, considering expression patterns of all or part of said
30 proteins, to determine NASH fingerprint.

Apolipoprotein A1 (APA1) is the protein component of a lipoprotein that carries lipids in blood. Variations in APA1 levels associated to hepatic fibrosis have been described [Teare J.P., et al., Lancet (North American Edition), 1993, 342:895-898].

Mitochondrial ATPase β subunit (ATPB) is a component of mitochondrial ATPase (or mitochondrial ATP synthase), that catalyses ATP synthesis from ADP and inorganic phosphorous in mitochondria using the energy derived from a proton gradient.

Leukotriene A₄ hydrolase or LKHA is an enzyme involved in leukotriene biosynthesis and is a marker for inflammation in general [Eberhard J., 2002, Virchows Archiv, 440(6):627-634].

It has been described that in both NASH and ASH there is an alteration in the ratio keratin 18/ keratin 8 [Denk H., et al., Der Pathologe, 2001, 22(6):388-398]. In addition, keratin 18 (K1CR) levels are indicators of other liver diseases such as hepatic carcinoma, chronic hepatitis, alcoholic hepatitis and cryptogenic cirrhosis [Caulin C., Journal of Cell Biology, 2000, 149(1):17-22; Toivola D.M., et al., Experimental Cell Research, 2000, 255(2):156-170; Stumptner C., et al., Hepatology, 1997, 26(4, part 2):194A; Ku Nam-On, et al., Journal of Clinical Investigation, 1997, 99(1):19-23].

Guanidinoacetate N-methyltransferase (GAMT) is a protein involved in the last step of creatinine biosynthesis. Superoxide dismutase (SODC) is a protein that destroys radicals that are toxic for cells. Albumin (ALBU) is a low molecular weight protein which is soluble in diluted saline solutions and water. It can bind water, ions (sodium, potassium or calcium), fatty acids, hormones, etc. Antioxidant protein 2 (AOP2) protects against oxidative damage. Methionine adenosyl transferase (MAT) catalyses AdoMet formation from methionine and ATP. Long-chain acyl-CoA dehydrogenase (ACDL) is an enzyme that is involved in the mitochondrial beta-oxidation of fatty acids. Selenium binding protein (SBP) binds selenium and acetaminophen.

Prohibitin 1 (PHB1) is a protein that is associated with the inner mitochondrial membrane whose function has been related to the folding and stabilization of proteins involved in mitochondrial respiratory processes. Deficiency of PHB1 has been associated with an alteration of the mitochondrial function and to premature aging. Its relationship with liver cancer has been described [Seow T.K., et al., Electrophoresis, 2000, 21(9):1787-1813].

No relationship between the expression of the said proteins and the development of NASH has been previously established, thus, their use as molecular markers and fingerprint for NASH has turned out to be surprising.

Therefore, one aspect of this invention is a method for the collection of data that allows for the early diagnosis or confirmation of NASH, which comprises the *in vitro*

detection and quantification of the levels of a protein selected from apolipoprotein A1, mitochondrial ATPase β subunit, leukotriene A₄ hydrolase, keratin 18, guanidinoacetate N-methyltransferase, superoxide dismutase, albumin, antioxidant protein 2 (isoform 1), prohibitin 1, methionine adenosyl transferase, long-chain acyl-CoA dehydrogenase, selenium binding protein, antioxidant protein 2 (isoform 2) and their combinations, in a sample of liver tissue from a subject and the comparison of the obtained results with normal values, of reference, of said proteins in liver tissue obtained from healthy livers. In a particular embodiment, said protein is selected from apolipoprotein A1, mitochondrial ATPase β subunit, leukotriene A₄ hydrolase, keratin 18, prohibitin 1 and their combinations.

The method provided by this invention allows the easy and reliable evaluation of the potential risk of a subject to develop NASH. Said subject may be a subject who has not been previously diagnosed with NASH or a subject who has been diagnosed with NASH but wants to confirm the diagnosis. Therefore, in a particular embodiment, said method allows the evaluation of the predisposition (early diagnosis) of a subject to develop NASH, while in another particular embodiment, said method allows the confirmation (diagnosis) of the existence of NASH in a subject.

In another aspect, the invention is related to the use of a protein selected from apolipoprotein A1, mitochondrial ATPase β subunit, leukotriene A₄ hydrolase, keratin 18, guanidinoacetate N-methyltransferase, superoxide dismutase, albumin, antioxidant protein 2 (isoform 1), prohibitin 1, methionine adenosyl transferase, long-chain acyl-CoA dehydrogenase, selenium binding protein, antioxidant protein 2 (isoform 2) and their combinations, in an *in vitro* method for the diagnosis of NASH, or for the evaluation of the predisposition of a subject to develop NASH.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1 shows the list of the proteins differentially expressed in MAT1A^{-/-} mutant mice during the development of NASH. Liver extracts from 1-, 15-, 90- and 240-day-old WT and MAT1A^{-/-} mice were analyzed by two-dimensional electrophoresis.

- 5 Proteins differentially expressed were identified by MALDI TOFF mass spectrometry and clustered by the biological processes in which they are involved according to gene ontology criteria: (1) Cell communication; (2) Cell growth and/or maintenance; (3) Developmental processes.

- 10 Figure 2 is a chart that illustrates the metabolic alterations of MAT1A^{-/-} mutant mice livers during the progression of NASH. Metabolic enzymes which were up- or down-regulated in the liver of 1-, 15-, 90- and 240 day-old MAT1A^{-/-} mutant mice were mapped in the wall chart "Biochemical Pathways" of Boehringer Mannheim (<http://www.expasy.org>) using the program GARBAN developed in the University of Navarra.

- 15 Figure 3A shows the results of a Western blot analysis, more specifically, it shows hepatic levels of PHB1, COX I, COX II, ATPB, in a steady state, in WT y MAT1A^{-/-} mice livers. 1 to 240 day-old mice liver extracts (15 µg/lane) were analyzed by Western blotting. To ensure equal loading, membranes were stained with Ponceau Red. Figure 3B shows the results of a Northern blot analysis, more specifically of the
20 expression of PHB1, COX II, ATPB, and rRNA 16S in WT and MAT1A^{-/-} mice livers. Samples of liver RNA (30 µg/lane) from 90 day-old mice were analyzed by a Northern blot hybridization analysis using specific probes. Membranes were hybridized with a probe for rRNA 18S to ensure equal loading. Figure 3C shows the results of a Southern analysis, more specifically of mitochondrial DNA in MAT1A^{-/-} mice in relation to WT
25 mice. Total DNA was isolated from 3 month-old mice, cleft with EcoRI and used in a Southern analysis with a specific probe for COX II. Equal loading of DNA samples in each of the lanes was ensured by ethidium bromide staining of the gel. Representative blots from three independent experiments are shown.

- Figure 4 is a bar chart that shows the inner mitochondrial membrane potential.
30 Membrane functionality was studied by means of the measurement of said gradient in an enriched mitochondrial fraction from 3 month-old WT and MAT1A^{-/-} mice livers. Value of 100% was 175,51±6,69 fluorescence units /mg protein. The average of three experiments is shown.

Figure 5 illustrates PHB1 level regulation by AdoMet in cultured rat hepatocytes. PHB1 levels were measured in rat hepatocytes cultured for 12 or 24 hours in the presence or absence of 100 μ M methionine, 4 mM AdoMet or 20 mM cycloleucine. Liver extracts (15 μ g/lane) were analyzed by Western blotting using specific antibodies. To ensure equal loading, the membranes were stained with red Ponceau. A representative blot from three independent experiments is shown.

Figure 6A shows hepatic steady-state levels of PHB1, COX I and COX II in WT and ob/ob mice livers. A representative blot from three independent experiments is shown. Figure 6B shows hepatic steady-state levels of PHB1 and COX I in control and obese patient livers. Liver extracts (15 μ g/lane) were analyzed by Western blotting using specific antibodies. To ensure equal loading, the membranes were stained with red Ponceau.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

In one aspect, the invention is related to an *in vitro* method for the diagnosis of NASH, or to evaluate the predisposition of a subject to develop NASH. A method like the one provided by this invention allows for the evaluation of the predisposition or risk of a subject to develop NASH, that is to say that permits the determination of those subjects that, within a group or population, show a higher risk of developing NASH. In an illustrative way, a subject who has not been previously diagnosed with NASH or who has no symptoms may be analyzed in order to obtain information about the possibility of that subject developing NASH in the future.

Likewise, said method might be used with diagnosis (diagnosis method) or prognostic (prognostic method) purposes. A diagnosis method refers to an assay performed on a subject who presents possible NASH symptoms. A prognostic method refers to a method that helps predict, at least at some extent, the progress of the disease. In this sense, a subject who has been previously diagnosed with NASH might be analyzed to know the progress of the disease as well as to know the possibility of a favorable response to a certain therapeutic treatment.

The term "subject" as used in the present invention includes human beings and animals, for example, mammals. In a particular embodiment, said subjects are human beings, females or males, of any age or race.

The term "non-alcoholic steatohepatitis" or "NASH" is used in the sense which is nowadays admitted by the scientific community.

In a more specific way, the invention provides a method that comprises:

- a) obtaining a sample of liver tissue from a subject;
- 5 b) detecting and quantifying in said sample of liver tissue the level of a protein selected from apolipoprotein A1 (APA1), mitochondrial ATPase β subunit (ATPB), leukotriene A₄ hydrolase (LKHA), keratin 18 (K1CR), guanidinoacetate N-methyltransferase (GAMT), superoxide dismutase (SODC), albumin (ALBU), antioxidant protein 2 (AOP2) (isoform 1 y 2), prohibitin 1 (PHB1), methionine adenosyl
- 10 transferase (MAT), long-chain acyl-CoA dehydrogenase (ACDL), selenium binding protein (SBP) and their combinations; and
- c) comparing the results obtained in step b) with normal values of reference for said proteins in liver tissue.

15 The liver tissue sample to be analyzed may be a liver tissue sample from any part of the liver of the subject whose susceptibility to develop NASH, or whose diagnosis of NASH, is intended to be known. Said liver tissue sample from said subject may be obtained by any conventional method, for example, by biopsy.

 Detection and quantification in a liver tissue sample of the levels (concentration) of said proteins APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU, AOP2 (isoform

20 1), AOP2 (isoform 2), PHB1, MAT, ACDL and/or SBP can be performed by the use of specific antibodies against said proteins, by ELISA or Western Blotting. Alternatively, said proteins can be detected and quantified by the use of devices of the kind of biochips or protein microarrays which include specific antibodies against proteins to be detected , for example, detection microarray systems that allow the detection and quantification of

25 target proteins (Huang, RP. Detection of multiple proteins in an antibody-based protein microarray system. Journal of Immunological Methods 225 (2001): 1-13). The term "antibody" as used herein includes monoclonal and polyclonal antibodies, recombinant fragments of antibodies, combibodies, Fab and scFv antibody fragments as well as the ligand binding domains.

30 Even though, in principle, the detection and quantification of the level of just one of said proteins would be enough, in practice, it is preferable to detect and quantify the level of two or more of said proteins to obtain the fingerprint of the subject in relation to its susceptibility to develop NASH or to confirm a diagnosis of NASH.

The results obtained in step b), related to the detection and quantification of proteins APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU, AOP2 (isoform 1), AOP2 (isoform 2), PHB1, MAT, ACDL and/or SBP in an liver tissue sample, are compared with normal values of reference for said proteins in liver tissue from healthy
5 livers. Said reference normal values of said proteins in liver tissue may be obtained by the analysis and quantification of said proteins in liver tissue samples from healthy livers, that is to say, from livers of subjects who have not developed NASH nor any other liver disease that could originate inadequate reference values for said proteins. In general, increases or decreases in the levels of marker proteins are estimated by
10 comparison of the results obtained from the analyses of samples from assay subjects with results obtained from control samples that are analyzed at the same time. In each assay, each subject will be compared with previously validated control samples.

When the comparison of the results obtained in step b) with reference normal values shows that:

15 (i) the level (concentration) of, at least, one of proteins APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU or AOP2 (isoform 1), is higher than the highest limit of the normal values, of reference, for said proteins in liver tissue; and/or

(ii) the level (concentration) of, at least, one of proteins PHB1, AOP2 (isoform 2), MAT, ACDL or SBP is lower than the lowest limit of the normal values, of
20 reference, for said proteins in liver tissue,

then, said results are indicative of the existence of NASH in the subject whose liver tissue sample has been assayed or there is a predisposition or high risk of said subject to develop NASH in the future.

A method like the one previously described allows for obtaining data for the
25 early diagnosis of NASH or for the confirmation of NASH presence.

In a particular and preferred embodiment of the method provided by this invention, marker protein of NASH is selected from APA1, ATPB, LKHA, K1CR, PHB1 and their combinations. In this case, a level (concentration) of, at least, one of proteins APA1, ATPB, LKHA or K1CR, higher than the highest limit of the normal
30 reference values for said proteins in liver tissue and/or a level (concentration) of PHB1 lower than the lowest limit of the normal reference values for said protein in liver tissue, is indicative of the existence of NASH in the subject whose liver tissue sample has been assayed or there is a predisposition or high risk of said subject to develop NASH in the

future. Even though, in principle, the detection and quantification of the level of just one of said proteins would be enough, in practice, it is recommendable to detect and quantify the level of at least two of them, preferably three, more preferably four and even more preferably, the levels of the five mentioned proteins because that would allow for the fingerprint of the subject in relation to its predisposition to develop NASH or to confirm a diagnosis of NASH.

In another aspect, the invention is related to the use of a protein selected from APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU, AOP2 (isoform 1), AOP2 (isoform 2), PHB1, MAT, ACDL, SBP and/or their combinations, preferably APA1, ATPB, LKHA, K1CR, PHB1, and/or their combinations, in an *in vitro* method to diagnose NASH, or to evaluate the predisposition of a subject to develop NASH.

The following example illustrates the invention and should not be considered in a limiting sense of the invention.

15

EXAMPLE 1

Proteomic functional analysis of non-alcoholic steatohepatitis (NASH)

Molecular mechanisms involved in the progression of NASH in MAT1A^{-/-} mice livers have been studied by a high throughput proteomic approach.

20

1. Material and methods

1.1. Materials

Antibodies of anti-cytochrome c oxidase subunits I and II were obtained from Molecular Probes. Anti-prohibitin 1 antibody was purchased from Calbiochem. Anti-mitochondrial ATP synthase subunit β was obtained from Molecular Probes. Electrophoresis reactants were obtained from Bio-Rad. Trypsin, from Promega; urea and collagenase from Gibco BRL; and tiourea from Merck. The other chemical reactants were purchased from Sigma.

Animals [wild type mice (WT) and knockout mutants lacking gene *MAT1A* (*MAT1A*^{-/-}) or MATO mice (Lu S.C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001; 98:5560-5565)] came from the applicants inbred colony and were treated humanely according to the institutional guidelines of the applicants. *Ob/ob* mice were purchased from Jackson Laboratories (Bar Harbor, MI). Human samples were obtained from the Hospital Príncipe de Asturias, whose human research review committee approved this study.

1.2. Methods

High throughput proteomic analysis.

Liver samples were homogenized in 20 volumes of lysis buffer which contained
5 7 M urea, 2 M thiourea, 4% CHAPS, 1% DTT and 0.5% Bio-Lyte 3-10 ampholytes. The homogenates were centrifuged at 100,000 x g for 45 minutes at 15°C. Protein concentration was determined in the supernatants by means of the Bradford protein assay kit (Bio-Rad) using albumin diluted in lysis buffer as standard. The first separation, by isoelectrofocusing, was performed in a Protean IEF cell (Bio-Rad) using 17
10 cm ReadyStrips IPG strips with different pH ranges. The samples (300-700 µg of protein) were loaded and an active rehydration was performed for 12 h at 50 V and 20°C. Gels were run at 60,000 Vh by using a progressively increasing protocol implemented by the manufacturer. IPG strips were equilibrated in 50 mM Tris/HCl, pH 7.5, 6 M urea, 30% glycerol, 2% SDS and 2% DTT and incubated in the same buffer containing
15 iodoacetamide and bromophenol blue in the absence of DTT. IPG strips were directly loaded in 12.5 % polyacrylamide gels (18 cm x 20 cm x 1 mm) and sealed with low-melting-point agarose. Gels of the second separation, by SDS-PAGE, were run for 15 h. Gels were stained with PhastGel BlueR prepared in water (65%), ethanol (25%) and acetic acid (10%). Alternatively, they were stained with silver using the Amersham
20 silver staining kit. Images were digitized with an Image Densitometer from Bio-Rad and analyzed by using PDQuest software. Qualitative and quantitative differences were detected but they were only accepted when confirmed, at least, twice, in five independent experiments. Gel spots corresponding to differentially expressed proteins were picked up manually and processed in a Micromass MassPrep station. Gel
25 specimens were de-stained with 50 mM ammonium bicarbonate and 50% acetonitrile (Coomassie-stained gels) or with 15 mM potassium ferricyanide and 50 mM sodium thiosulphate (Silver-stained gels). Subsequently, proteins were reduced with 10 mM DTT in 100 mM ammonium bicarbonate and were alkylated with 55 mM iodoacetamide in the same buffer. After that, a digestion of the proteins was performed in the same gel
30 with trypsin 6 ng/µl in 50 mM ammonium bicarbonate, for 5 h at 37°C. The resulting peptides were extracted with 1% formic acid and 2 % acetonitrile. Finally, 2 µl samples were mixed with 2 µl of a saturated solution of a-cyano-4-hydroxy-trans-cinnamic acid in 0.1% TFA, 50% acetonitrile and then spotted into a MALDI target plate. Fragments

obtained from the digestion with trypsin were analyzed in a MALDI TOFF GL-REF mass spectrometer (Micromass). Data processing was performed with MassLynx and database searching (SWISSPROT, TREMBL, ENSEMBL) to identify the proteins of interest from their peptide fingerprint was performed with ProteinLynx Global Server
 5 (Micromass). Data analysis and clustering was performed with GARBAN (unpublished).

Isolation and culture of rat hepatocytes.

Hepatocytes were isolated from male Wistar rats (200-250 g) by perfusion with collagenases, as previously described (Avila, M.A., et al., Gastroenterology, 1998,
 10 114:364-371). Once isolated, hepatocytes were cultured according to García-Trevijano et al. (García-Trevijano, E.R., et al., Faseb J, 2000, 14:2511-2518) in the presence or absence of 4 mM AdoMet, 100 µM methionine, or 20 mM cicloleucine (CL) for the indicated periods of time. Cell viability was measured by trypan blue exclusion, and no significant differences were observed between the controls and any of the different
 15 treatments performed in this study.

Mitochondrial isolation and characterization.

An enriched mitochondrial fraction was obtained from 100 mg liver specimens with the Mitochondria Isolation Kit from Sigma. The electrochemical proton gradient
 20 (??) of the inner mitochondrial membrane was analyzed by measuring the uptake of the fluorescent carbocyanine dye JC-1 into the mitochondria according to the manufacturer's instructions. Fluorescence measures were performed with a Perkin Elmer LS 50 B spectrofluorimeter.

RNA isolation and Northern hybridization analysis.

Total liver RNA was isolated by the guanidinium thiocyanate method (García-Trevijano, E.R., et al., Faseb J, 2000, 14:2511-2518). RNA concentration was determined spectrophotometrically before use and the integrity was checked by electrophoresis with subsequent ethidium bromide staining. Electrophoresis and gel
 30 blotting were performed following a previously described protocol (Lu, S.C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001; 98:5560-5565). Prohibitin 1cDNA was cloned by reverse transcriptase-polymerase chain reaction from mouse liver. The Superscript preamplification system (Life Technologies), Taq Long plus enzyme (Stratagene) and

sense 5'-atggctgccaagtgtttgagtc-3' and antisense 5'-tcactggggaagctggagaagc-3' primers were used. Probes for ATPase β subunit and for cytochrome oxidase subunits I and II have been described (Izquierdo & Cuezva, Mol. Cell. Biob, 1997, 17:5255-5268; Otero, G., et al., Carcinogenesis, 1997, 18:1569-1575). Northern hybridization analysis were performed on total RNA by using standard procedures (Lu S.C., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001; 98:5560-5565). All probes were labeled with [32 P]dCTP by using the Rediprime DNA Labeling System from Amersham. To ensure equal loading of RNA samples, membranes were also hybridized with a probe labeled with 32 P rRNA 8S. Both autoradiography and densitometry were used to quantify relative RNA. Results of the Northern blot analysis were normalized to 18S rRNA.

DNA isolation and Southern blot analysis.

Total DNA was extracted from the livers of 3-month-old WT and MAT1A $^{-/-}$ mice as previously described (34). Total cellular DNA (20 μ g) was digested with EcoRI. Digested DNA was resolved in an agarose 1% gel, transferred and fixed onto nylon membranes. The membranes were incubated with a COX II probe labeled with [32 P]dCTP. Membrane hybridization and washing conditions were described above (Otero, G., et al., Carcinogenesis, 1997, 18:1569-1575).

Western Blot analysis.

Protein extraction and western blotting were performed as previously described (Avila, M.A., et al., Oncogene, 1995, 10:963-971; Ruiz, F., et al., Hepatology, 1998, 28:1051-1057). Briefly, equal amounts of protein (15 μ g) were resolved in SDS/12.5% polyacrylamide gels. Proteins were electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes. Membranes were probed with anti-MAT (Ruiz, F., et al., Hepatology, 1998, 28:1051-1057), anti-PHB1, anti- β ATPase and anti-COX I and II. A secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase was used. Blots were developed by chemiluminescence (Dupont).

2. Results

Proteomic fingerprint of NASH pathogenesis in MAT1A $^{-/-}$ mice.

Molecular mechanisms involved in NASH development in MAT1A $^{-/-}$ mice liver have been studied by a high throughput proteomic approach. Protein expression patterns

were obtained by two-dimensional analysis of 1-, 15-, 90- and 240-day-old WT and MAT1A^{-/-} mice liver extracts. Five independent experiments were performed using liver extracts obtained from different animals. According to the PDQuest image analysis (BioRad), an average of 1,500 to 2,000 spots were visualized depending on the gel staining procedure. Gel images obtained from WT and MAT1A^{-/-} mice were compared to determine differences in protein expression. Only those changes in which a two-fold increase or a decrease by half was confirmed in the five experiments were accepted.

Analysis revealed that just 1 day after birth, 140 differences were already induced in the liver of MAT1A^{-/-} mice and that changes accumulated with age (242, 259 and 297 changes 15, 90 and 240 days after, respectively). The distribution between up-regulated and down-regulated proteins is maintained up to three months. 53%-70% were up-regulated and 30%-47% were down-regulated proteins. In contrast, this pattern switches in 8-month-old MAT1A^{-/-} mutant mice livers, when NASH is already developed, where 27% were up-regulated and 73% were down-regulated proteins. From all the initial changes, only the most abundant proteins represented in the databases were identified by peptide mass fingerprinting, with a result of 117 proteins successfully identified.

A linear correlation between M_r and pI , calculated from the sequence of the identified proteins, and the experimental R_f of the corresponding spot, calculated from the two-dimensional gels (not shown), has been found. This finding further validates the identity of the analyzed spots. Some pI deviations from linearity were observed. This is probably a consequence of post-translational modifications.

The specific protein expression profile of MAT1A^{-/-} mice livers provides a proteomic fingerprint of NASH. Up- and down-regulated proteins were classified by the biological processes in which they are involved according to the gene ontology criteria, and were represented as shown in Figure 1. Most proteins differentially expressed in MAT1A^{-/-} mutant mice livers were clustered in three biological processes: cell communication (group 1), cell growth and/or maintenance (group 2) and developmental processes (group 3) (Figure 1). Some of the proteins identified in these clusters are involved in embryogenesis, morphogenesis and aging processes, such as tubulin α -6 chain, tubulin α -5 chain, actin and prohibitin 1 (PHB1), that controls DNA synthesis and regulates cell proliferation. Likewise, proteins involved in stress responses, such as leukotriene A₄ hydrolase (LKHA), are up-regulated. Changes in the expression pattern

of proteins involved in oxidative stress were also identified, for example, glutathione peroxidase, antioxidant protein 1 and 2 (AOP2) or superoxide dismutase $\text{Cu}^{++}/\text{Zn}^{++}$ (SODC). Finally, according to the broad metabolic activity of the liver, 80% of the proteins whose expression changes in MAT1A^{-/-} mutant mice corresponds to metabolic proteins. Most of the alterations affect carbohydrate and amino acid metabolism. For example, fructose 1,6-bisphosphatase (up-regulated) and glycerol 3 phosphate dehydrogenase (down-regulated) are key enzymes in gluconeogenesis and glycolysis respectively. Specific long-chain acyl-CoA dehydrogenase (ACDL) and delta 3,5 delta 2,4 dienoyl CoA isomerase (both down-regulated) are involved in fatty acid beta-oxidation. Apolipoprotein A1 (APA1) (up-regulated) and farnesyl pyrophosphate synthetase (down-regulated) take part in the transport and biosynthesis of cholesterol respectively; and malate dehydrogenase and isocitrate dehydrogenase (both down-regulated) catalyze two steps of the citrate cycle. In addition, major differences affecting branched, aromatic and sulfur amino acid metabolism were identified (Figure 2).

A group of 12 proteins changed their expression pattern 1 day after birth and this alteration was maintained all along the progression of NASH in MAT1A^{-/-} mice livers (Figure 1). These proteins, which might be considered as early markers of NASH, were identified as APA1, LKHA, selenium binding protein (SBP), AOP2, MAT, keratin type 1 cytoskeletal 18 (K1CR), guanidinoacetate methyltransferase (GAMT), PHB1, SODC, albumin, ACDL and mitochondrial ATPase β subunit (ATPB). Most of these proteins are metabolic enzymes or take part in the antioxidant response of MAT1A^{-/-} mutant mice hepatocytes. Interestingly, PHB1 and ATPB are mitochondrial proteins, so changes on their expression might compromise mitochondrial function.

AdoMet regulates a network of mitochondrial proteins and mitochondrial function.

Alteration of the mitochondrial function may be a key factor in the progression of NASH in MAT1A^{-/-} mice. Up-regulation of ATPB (450%) and down-regulation of PHB1 (53%) were confirmed by Western blot analysis with specific antibodies (Figure 3A). Likewise, the steady state levels of cytochrome c oxidase subunits I and II (COX) were also diminished in MAT1A^{-/-} mutant mice livers (55% and 53% respectively). These alterations were not observed in other tissues (not shown). The expression of genes which encode for these proteins was also studied by Northern blot analysis. The mRNA level of ATPB is increased two-fold in MAT1A^{-/-} mice livers (Figure 3B). On

15 **Regulation of PHB1 by AdoMet.**

25

In order to evaluate whether the alterations observed in MAT1A^{-/-} mice provide new mechanisms of NASH induction, the steady state levels of PHB1 and COX were studied in ob/ob mice liver samples and in obese patients, two conditions which favor the development of NASH. Western blot analyses revealed that PHB1 and COX I, II are down-regulated in ob/ob mice livers (76% and 81% and 70% respectively). Down-regulation of PHB1 (53%) and COX I (82%) was also confirmed in obese patient livers

although COX II levels were similar to those found in control livers (Figure 6). As in MAT1A^{-/-} mice, mRNA levels of PHB and COX I and II in ob/ob mice and obese patients are correlated with the levels found in non-control animals (not shown).

5

3. Discussion

AdoMet has been generally considered as an intermediary central metabolite involved in the synthesis of homocysteine and polyamines as well as the main cellular methyl group donor. However, recent findings evidence that, in addition to this central metabolic function, AdoMet is a cellular control switch that regulates essential hepatocyte functions such as proliferation, differentiation and death (Mato, J.M. et al., Faseb J, 2002, 16:15-26). In order to better understand the mechanisms by which these non-traditional AdoMet functions take place, NASH pathogenesis was studied in mutant MAT1A^{-/-} mice deficient in hepatic AdoMet synthesis by using a high throughput proteomic approach.

The analysis of the different protein expression patterns in MAT1A^{-/-} and WT mice indicates that a chronic deficiency in the synthesis of AdoMet has a pleiotropic effect in the liver altering essential hepatic functions. 117 proteins which are differentially expressed in MAT1A^{-/-} mice livers during NASH progression have been identified. The global analysis of the observed differences shows up-regulation of the expression of antioxidant proteins (SODC, catalase, glutathione peroxidase) in MAT1A^{-/-} mice livers that might reflect an adaptation mechanism to dissipate oxidative stress generated by oxidant genes. Major metabolic alterations were also found in the expression of proteins in mutant MAT1A^{-/-} mice livers. Lipid, carbohydrate and amino acid metabolism is impaired in MAT1A^{-/-} mice from their birth, although the differences accumulate during NASH progression. These up- and down-regulated proteins provide an specific proteomic pattern. This pattern might explain some of the metabolic alterations reminiscent of those found in obesity and other conditions associated to NASH, which lead to the development of cirrhosis and HCC (Ried, A.E., Gastroenterology, 2001, 121:710-723; Angulo, P., N. Engl. J. Med., 2002, 346:1221-1231; Clark, J.M., et al., Gastroenterolgy, 2002, 122:1649-1657).

The analysis of the 117 proteins differentially expressed in MAT1A^{-/-} mice livers revealed that most of the changes observed 1 day after birth are not maintained during NASH progression. These time-dependent differences may reflect the adaptation

of the hepatocyte to perform its normal biological function under a chronic AdoMet deficiency, leading to an accumulation of alterations that condition the development of the disease. However, 12 proteins change their expression pattern after birth when MAT1A^{-/-} is switched on in WT mice, and this alteration is maintained to the onset of histological lesions. Among these early changes are the up-regulation of SODC and AOP2, which was deduced from two-dimensional gels according to previous evidences (Rabilloud, T., et al., J. Biol. Chem., 2002, 277:19396-19401), as well as the down-regulation of ACDL and up-regulation of APA1 may be mentioned. These alterations agree with the implication of the oxidative stress and abnormal lipid metabolism in the pathogenesis of fatty liver disease. Interestingly, 4 proteins involved in mitochondrial function were also identified: ATPB, COX I, COX II and PHB1. Up-regulation of ATPB has been implicated in mitochondrial maturation and in cell neoplastic transformation, which is consistent with the proliferative and dedifferentiated state of MAT1A^{-/-} hepatocytes. Down-regulation of COX indicates a deficient transference of electrons to oxygen, the last step in the mitochondrial electron transference chain and due to this, provides a molecular explanation for the oxidative stress found in MAT1A^{-/-} livers. The fall in PHB1 steady state levels might explain down-regulation of COX. PHB1 is the product of a nuclear gene which is associated to the inner mitochondrial membrane. PHB1 has been recently proposed to be a chaperone-type protein which takes part in the correct folding and assembly of some components of the mitochondrial respiratory chain. According to this hypothesis, a deficiency in PHB1 may impair the native and functional organization of respiratory proteins which are later degraded by mitochondrial proteases, compromising mitochondrial functionality. This is the reason why a decrease in PHB1 might induce a reduction of COX with the concomitant loss of mitochondrial function in MAT1A^{-/-} hepatocytes.

Correlation between a deficiency in AdoMet synthesis and the down-regulation of PHB1 found in MAT1A^{-/-} mice was confirmed by the *in vitro* experiments on isolated rat hepatocytes. The reduction in the synthesis of AdoMet by using a culture medium without methionine or with CL, an inhibitor of MAT activity, results in the down-regulation of PHB1. The replenishment of the AdoMet content in hepatocytes prevented the fall of PHB1.

PHB1 steady state levels also decreased in ob/ob mice livers and in obese patients, who are prone to develop NASH. NASH is a chronic disorder with an

increasing prevalence in the population, thus becoming one of the priorities of clinic hepatology. Even though NASH pathogenesis is poorly known, the present evidence supports the existence of mitochondrial alterations which are correlated with oxidative stress as one of the most important factors. Down-regulation of PHB1 and COX induced
5 by a chronic deficiency of AdoMet, may provide a new molecular mechanism involved in NASH pathogenesis. The results obtained for MAT1A-/- mice, indicate that PHB1 and COX levels fell long before the manifestation of any histological symptom of the disease and, therefore, may be useful in the early diagnosis and treatment of NASH.

10 In summary, the obtained results provide a new mechanism by which a deficiency in AdoMet adversely affects mitochondrial function and generates an oxidative stress in the liver. The fall of PHB1 levels under a chronic lack of AdoMet which leads to mitochondrial failure and to abnormal metabolism of lipids, carbohydrates and amino acids might partially explain the pathogenesis of NASH.

CLAIMS

1. An *in vitro* method for the diagnosis of NASH, or for the evaluation of the susceptibility of a subject to develop NASH, that comprises:
 - 5 a) obtaining a liver tissue sample from a subject ;
 - b) detecting and quantifying in said liver tissue sample the level of a protein selected from apolipoprotein A1 (APA1), mitochondrial ATPase β subunit (ATPB), leukotriene A4 hydrolase (LKHA), keratin 18 (K1CR), guanidinoacetate N-methyltransferase (GAMT), superoxide dismutase
10 (SODC), albumin (ALBU), antioxidant protein 2 (AOP2) (isoforms 1 and 2), prohibitin 1 (PHB1), methionine adenosyl transferase (MAT), long-chain acyl-CoA dehydrogenase (ACDL), selenium binding protein (SBP), and their combinations; and
 - c) comparing the results obtained in step b) with normal reference values for said
15 proteins in liver tissue.
2. A method according to claim 1, in which said subject is a human being.
3. A method according to claim 1, in which the detection and quantification of
20 said protein selected from APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU, AOP2 (isoform 1), AOP2 (isoform 2), PHB1, MAT, ACDL and/or SBP is performed by means of the use of specific antibodies against said proteins.
4. A method according to claim 3, in which said antibodies comprise monoclonal
25 antibodies, polyclonal antibodies, recombinant fragments of antibodies, combibodies and fragments of Fab or scFv of specific antibodies against said proteins.
5. A method according to claim 1, in which the detection and quantification of
said protein selected from APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU, AOP2
30 (isoform 1), AOP2 (isoform 2), PHB1, MAT, ACDL an/or SBP is performed by ELISA or Western blotting techniques, or by the use of devices of the kind of biochips or protein microarrays which include specific antibodies against the proteins to be detected.

6. A method according to claim 1, which comprises the detection and quantification of the level of a protein selected from APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU, AOP2 (isoform 1), AOP2 (isoform 2), PHB1, MAT, ACDL and SBP.

5

7. A method according to claim 1, which comprises the detection and quantification of the level of two or more proteins, each one independently selected from APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU, AOP2 (isoform 1), AOP2 (isoform 2), PHB1, MAT, ACDL and SBP.

10

8. A method according to claim 1, in which when the comparison of the results obtained in step b) with normal values, of reference, indicates that:

(i) the concentration of, at least, one of the proteins APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU or AOP2 (isoform 1), is higher than the highest limit of the normal reference values for said proteins in liver tissue; and/or

(ii) the concentration of, at least, one of the proteins PHB1, AOP2 (isoform 2), MAT, ACDL or SBP is lower than the lowest limit of the normal values of reference for said proteins in liver tissue,

then, said results are indicative of the existence of NASH in the subject whose liver tissue sample has been assayed or of the existence of a susceptibility of said subject to develop NASH in the future.

9. A method according to claim 1, in which said protein to be detected and quantified is selected from APA1, ATPB, LKHA, K1CR, PHB1 and their combinations.

10. A method according to claim 9, that comprises the detection and quantification of the level of a protein selected from APA1, ATPB, LKHA, keratin 18 and PHB1.

11. A method according to claim 9, which comprises the detection and quantification of the levels of, at least, two proteins, each one independently selected from APA1, ATPB, LKHA, K1CR and PHB1.
- 5 12. A method according to claim 9, which comprises the detection and quantification of the levels of three or four proteins, each one independently selected from APA1, ATPB, LKHA, K1CR and PHB1.
- 10 13. A method according to claim 9, which comprises the detection and quantification of the levels of proteins APA1, ATPB, LKHA, K1CR and PHB1.
- 15 14. The use of a protein selected from apolipoprotein A1 (APA1), mitochondrial ATPase β subunit (ATPB), leukotriene A₄ hydrolase (LKHA), keratin 18 (K1CR), guanidinoacetate N-methyltransferase (GAMT), superoxide dismutase (SODC), albumin (ALBU), antioxidant protein 2 (AOP2) (isoforms 1 and 2), prohibitin 1 (PHB1), methionine adenosyl transferase (MAT), long-chain acyl-CoA dehydrogenase (ACDL), selenium binding protein (SBP), and their combinations, in an *in vitro* method to diagnose NASH or to evaluate the susceptibility of a subject to develop NASH.

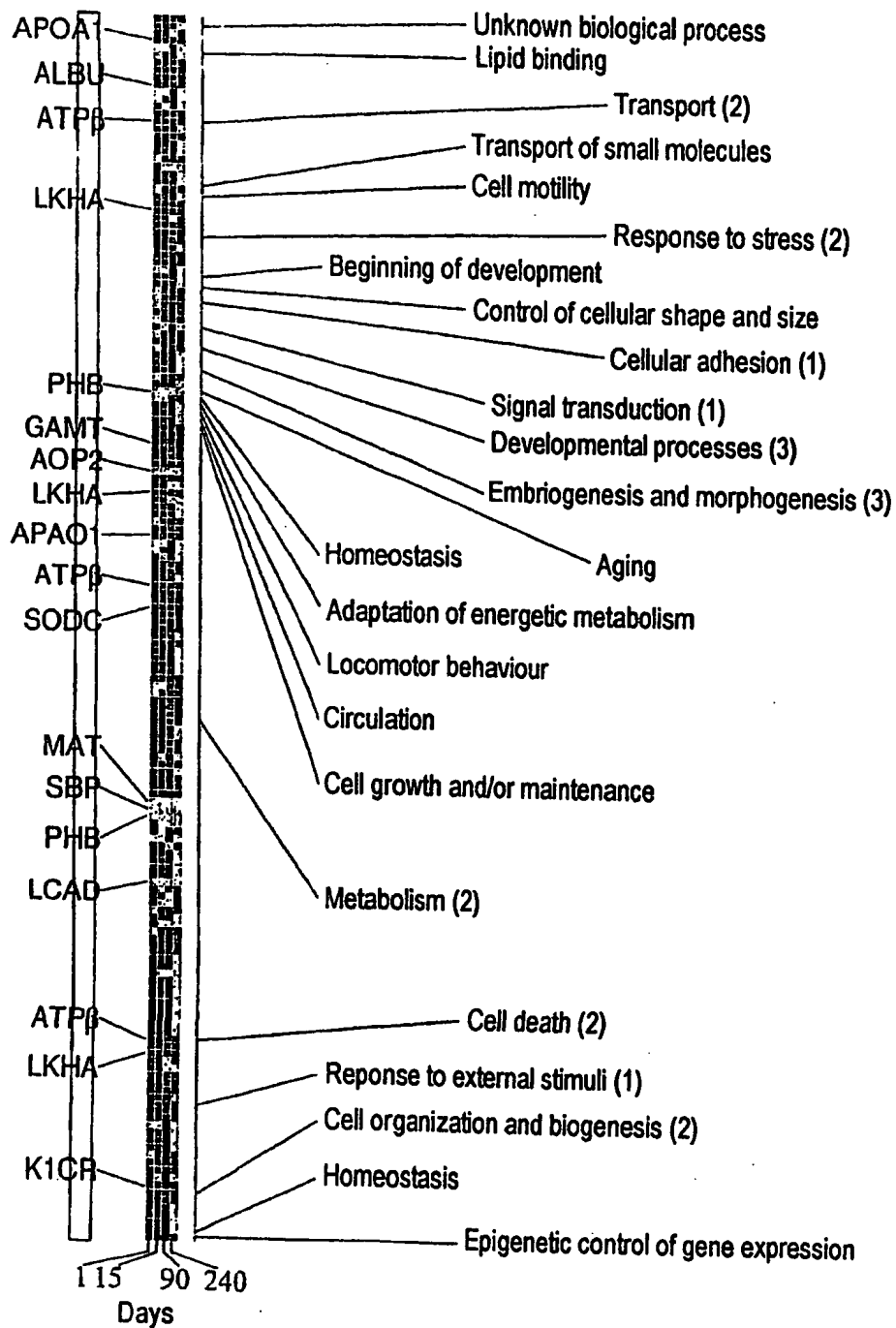


FIGURE 1

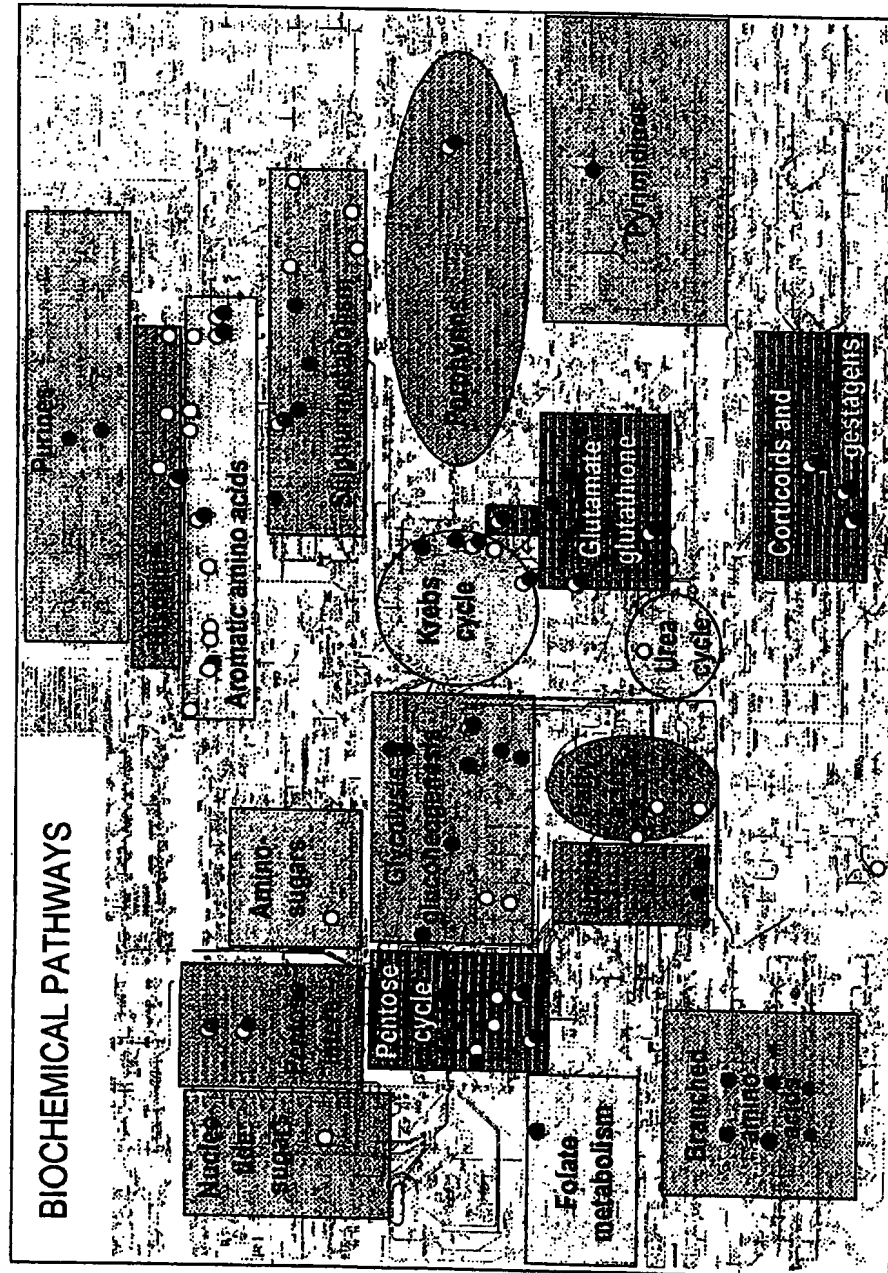


FIGURE 2

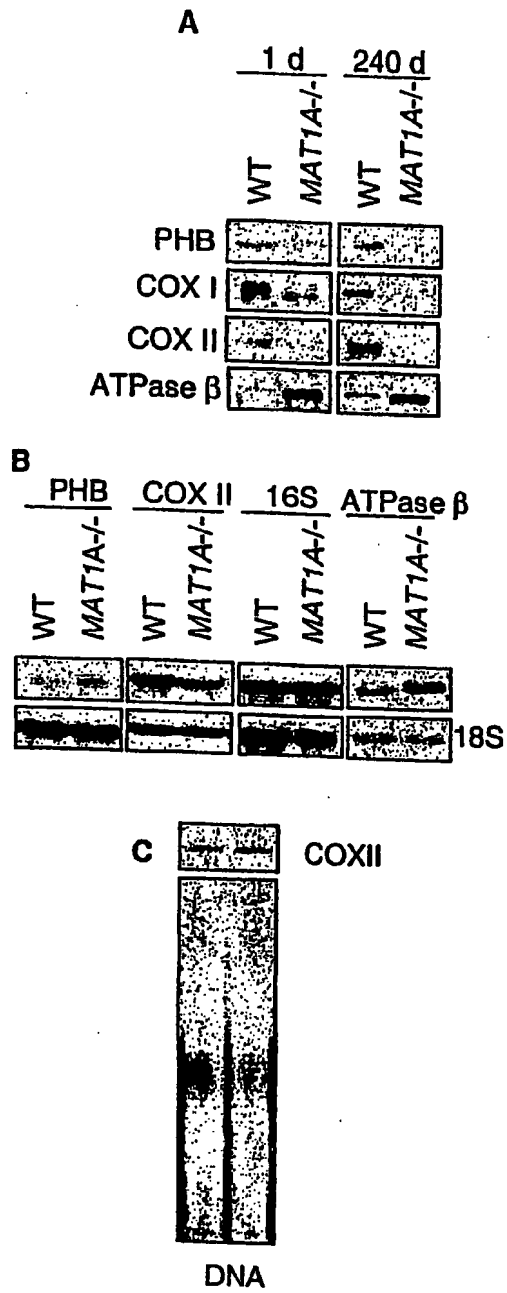


FIGURE 3

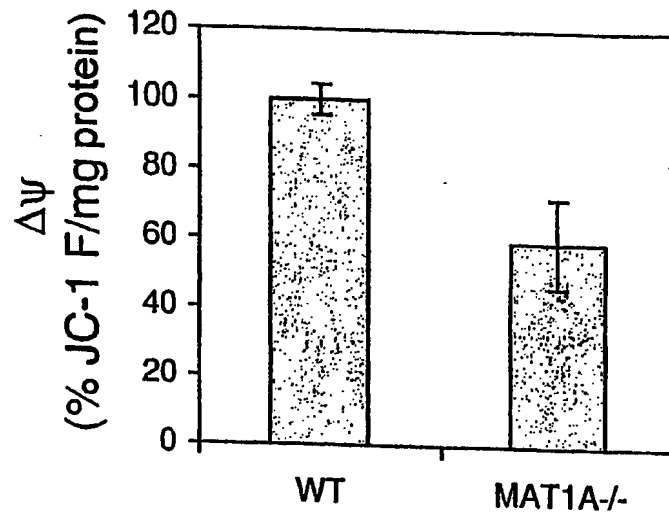


FIGURE 4

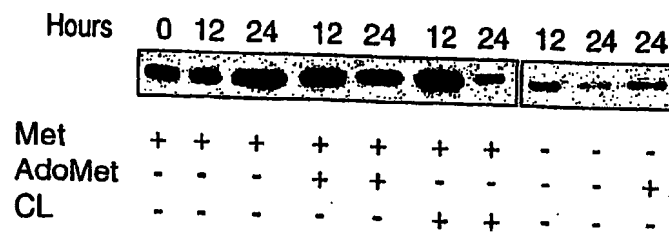


FIGURE 5

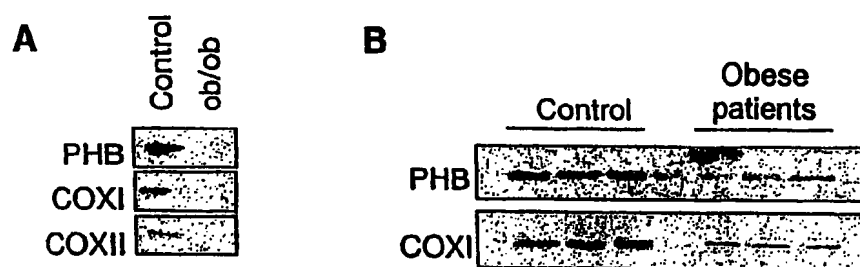


FIGURE 6



Oficina Española
de Patentes y Marcas

CERTIFICADO OFICIAL

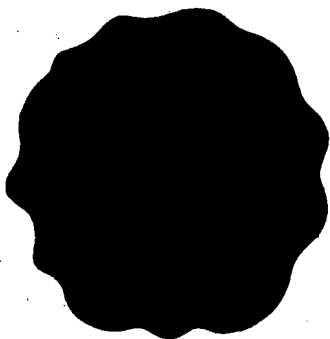
Por la presente certifico que los documentos adjuntos son copia exacta de los que obran en el expediente de PATENTE de INVENCION número 200202911, de acuerdo con la concesión efectuada con fecha 31 de Mayo de 2006.

Madrid, 21 de Febrero de 2007

El Director del Departamento de Patentes
e Información Tecnológica.

P.D.

ANA Mª REDONDO MÍNGUEZ





MINISTERIO
DE CIENCIA
Y TECNOLOGÍA



Oficina Española
de Patentes y Marcas

INSTANCIA DE SOLICITUD

NÚMERO DE SOLICITUD

P20 020 29 11

02 DIC 18 11:25

FECHA Y HORA DE PRESENTACIÓN EN LA O.E.P.M.

FECHA Y HORA PRESENTACIÓN EN LUGAR DISTINTO O.E.P.M.

(4) LUGAR DE PRESENTACIÓN:

CÓDIGO

MADRID

28

(1) MODALIDAD:

☒ **PATENTE DE INVENCION**

☐ **MODELO DE UTILIDAD**

(2) TIPO DE SOLICITUD:

☐ ADICIÓN A LA PATENTE

☐ SOLICITUD DIVISIONAL

☐ CAMBIO DE MODALIDAD

☐ TRANSFORMACIÓN SOLICITUD PATENTE EUROPEA

☐ PCT: ENTRADA FASE NACIONAL

(3) EXP. PRINCIPAL O DE ORIGEN:

MODALIDAD

Nº SOLICITUD

FECHA SOLICITUD

(5) SOLICITANTE (S): APELLIDOS O DENOMINACIÓN SOCIAL

FUNDACION PARA LA INVESTIGACION MEDICA

APLICADA

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO PAÍS

DNICIF

CNAE

PYME

ESPAÑOLA

ES

G82198524

73

(6) DATOS DEL PRIMER SOLICITANTE:

DOMICILIO **Pintor Paret 5, 1ºF**

LOCALIDAD **Pamplona**

PROVINCIA **Navarra**

PAÍS RESIDENCIA **España**

NACIONALIDAD **Española**

TÉLEFONO **948 425 600**

FAX **948 425 715**

CORREO ELECTRÓNICO **ferrasti@unav.es**

CÓDIGO POSTAL **31008**

CÓDIGO PAÍS **ES**

CÓDIGO PAÍS **ES**

(7) INVENTOR (ES):

APELLIDOS

NOMBRE

NACIONALIDAD

CÓDIGO

1.- Mato de la Paz

2.- Corrales Izquierdo

3.- Santamaría Martínez

José María

Fernando

Enrique

Española

Española

Española

PAÍS

ES

ES

ES

(8)

☐ EL SOLICITANTE ES EL INVENTOR

☒ EL SOLICITANTE NO ES EL INVENTOR O ÚNICO INVENTOR

(9) MODO DE OBTENCIÓN DEL DERECHO:

☒ INVEN. LABORAL

☐ CONTRATO

☐ SUCESIÓN

(10) TÍTULO DE LA INVENCION:

Método para el diagnóstico de esteatohepatitis no alcohólica (NASH) mediante el empleo de marcadores moleculares

(11) EFECTUADO DEPÓSITO DE MATERIA BIOLÓGICA:

☐ SI

☒ NO

(12) EXPOSICIONES OFICIALES: LUGAR

FECHA

(13) DECLARACIONES DE PRIORIDAD:

PAÍS DE ORIGEN

CÓDIGO
PAÍS

NÚMERO

FECHA

(14) EL SOLICITANTE SE ACOGE AL APLAZAMIENTO DE PAGO DE TASAS PREVISTO EN EL ART. 162. LEY 11/86 DE PATENTES

☐

(15) AGENTE /REPRESENTANTE: NOMBRE Y DIRECCIÓN POSTAL COMPLETA. (SI AGENTE P.I., NOMBRE Y CÓDIGO) (RELLENÉSE, ÚNICAMENTE POR PROFESIONALES)

(16) RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE SE ACOMPAÑAN:

☒ DESCRIPCIÓN Nº DE PÁGINAS: **23**

☒ Nº DE REMINDICACIONES: **14**

☒ DIBUJOS. Nº DE PÁGINAS: **5**

☐ LISTA DE SECUENCIAS Nº DE PÁGINAS:

☒ RESUMEN

☐ DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ TRADUCCIÓN DEL DOCUMENTO DE PRIORIDAD

☐ DOCUMENTO DE REPRESENTACIÓN

☒ JUSTIFICANTE DEL PAGO DE TASA DE SOLICITUD

☐ HOJA DE INFORMACIÓN COMPLEMENTARIA

☐ PRUEBAS DE LOS DIBUJOS

☐ CUESTIONARIO DE PROSPECCIÓN

☐ OTROS:

FIRMA DEL SOLICITANTE O REPRESENTANTE

(VER COMUNICACIÓN)

FIRMA DEL FUNCIONARIO

NOTIFICACIÓN SOBRE LA TASA DE CONCESIÓN:

Se le notifica que esta solicitud se considerará retirada si no procede al pago de la tasa de concesión; para el pago de esta tasa dispone de tres meses a contar desde la publicación del anuncio de la concesión en el BOPI, más los diez días que establece el art. 81 del R.D. 2245/1986.

ILMO. SR. DIRECTOR DE LA OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

informacion@oepm.es

www.oepm.es

C/ PANAMÁ, 1 • 28071 MADRID

NO CUMPLIMENTAR LOS RECUADROS ENMARCADOS EN ROJO



RESUMEN Y GRÁFICO

RESUMEN (Máx. 150 palabras)

MÉTODO PARA EL DIAGNÓSTICO DE ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA (NASH) MEDIANTE EL EMPLEO DE MARCADORES MOLECULARES

El método comprende detectar y cuantificar *in vitro*, en una muestra de tejido hepático, los niveles de una proteína, útil como marcador molecular de NASH, seleccionada entre apolipoproteína A1, subunidad β de la ATPasa mitocondrial, leucotrieno A4 hidrolasa, keratina 18, guanidina acetato N-metiltransferasa, superóxido dismutasa, albúmina, proteína antioxidante 2 (isoforma 1), prohibitina 1, metionina adenosil transferasa, acil CoA deshidrogenasa de cadena larga, proteína de unión al selenio, proteína antioxidante 2 (isoforma 2), y combinaciones de las mismas, y comparar los resultados obtenidos con los valores normales de dichas proteínas en tejido hepático sano. Dicho método permite diagnosticar NASH y/o evaluar el riesgo potencial de un sujeto a desarrollar NASH.

GRÁFICO



12

SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION

P 20 0202911

31 NÚMERO		DATOS DE PRIORIDAD		33 PAÍS		22 FECHA DE PRESENTACIÓN	
		32 FECHA				62 PATENTE DE LA QUE ES DIVISORIA	
71 SOLICITANTE (S) FUNDACION PARA LA INVESTIGACION MEDICA APLICADA DOMICILIO c/ Pintor Paret 5, 1ºF, E-31008 PAMPLONA (ESPAÑA) NACIONALIDAD Española							
72 INVENTOR (ES) José María Mato de la Paz, Fernando Corrales Izquierdo, Enrique Santamaría Martínez							
51 Int. Cl. 7 G01N 33/68, 33/576				GRÁFICO (SÓLO PARA INTERPRETAR RESUMEN)			
54 TÍTULO DE LA INVENCION Método para el diagnóstico de esteatohepatitis no alcohólica (NASH) mediante el empleo de marcadores moleculares							
57 RESUMEN MÉTODO PARA EL DIAGNÓSTICO DE ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA (NASH) MEDIANTE EL EMPLEO DE MARCADORES MOLECULARES El método comprende detectar y cuantificar in vitro, en una muestra de tejido hepático, los niveles de una proteína, útil como marcador molecular de NASH, seleccionada entre apolipoproteína A1, subunidad β de la ATPasa mitocondrial, leucotrieno A4 hidrolasa, keratina 18, guanidina acetato N-metiltransferasa, superóxido dismutasa, albúmina, proteína antioxidante 2 (isoforma 1), prohilbítina 1, metionina adenosil transferasa, acil CoA deshidrogenasa de cadena larga, proteína de unión al selenio, proteína antioxidante 2 (isoforma 2), y combinaciones de las mismas, y comparar los resultados obtenidos con los valores normales de dichas proteínas en tejido hepático sano. Dicho método permite diagnosticar NASH y/o evaluar el riesgo potencial de un sujeto a desarrollar NASH.							

MÉTODO PARA EL DIAGNÓSTICO DE ESTEATOHEPATITIS NO ALCOHÓLICA (NASH) MEDIANTE EL EMPLEO DE MARCADORES MOLECULARES

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se relaciona, en general, con el diagnóstico de la esteatohepatitis no alcohólica (NASH), en particular, con el diagnóstico precoz de la predisposición de un sujeto a desarrollar dicha enfermedad o con la confirmación de que un sujeto padece dicha enfermedad, basado en la identificación de unos marcadores moleculares de dicha enfermedad y/o en el análisis de los perfiles de expresión en hígado de dichos marcadores moleculares de NASH.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La esteatohepatitis no alcohólica (NASH) es una lesión aguda del hígado que se caracteriza por la aparición de necrosis, inflamación y fibrosis. La NASH y la esteatohepatitis alcohólica (ASH) son indistinguibles histológicamente y se piensa que tienen la misma etiología. En la actualidad se considera que la NASH es una enfermedad progresiva con un 25% de incidencia de cirrosis y un 10%-15% de incidencia de mortalidad. Además, se cree que es la causa de enfermedad hepática en la mayoría de los casos de cirrosis criptogenética (causa desconocida). Por tanto, el estudio de la NASH se ha convertido en uno de los temas prioritarios de la hepatología clínica. Una revisión de la NASH, su epidemiología, características, estrategias de diagnóstico y tratamiento ha sido elaborada por Andrea E. Reid [Reid A.E., Gastroenterology, 2001, 121:710-723].

Para hacerse una idea de la magnitud del problema, basta con indicar algunos datos epidemiológicos de la NASH:

- entre el 7% y el 11% de los pacientes que se someten a biopsia hepática en Estados Unidos y Canadá se detecta NASH;
- las mujeres representan entre el 60%-83% de los pacientes con NASH;
- alrededor del 30% de los pacientes obesos tienen NASH;
- la aparición de fibrosis se detecta en el 43% de los pacientes con NASH;
- la incidencia de cirrosis en pacientes con NASH es de aproximadamente el 25%;
- todos los pacientes que desarrollan cirrosis alcohólica (aproximadamente el 50%

de todas las cirrosis) han desarrollado previamente ASH; y

- la NASH es frecuente en los pacientes con hepatitis C.

Debido a esta posición prominente de la NASH entre las enfermedades crónicas y progresivas del hígado, existe un interés creciente en determinar su patogénesis. Sin embargo, los mecanismos patofisiológicos que conducen a la aparición de NASH no han sido aún determinados. Los alcohólicos pueden tener un hígado moderadamente graso durante muchos años y, sin ningún cambio en sus hábitos de bebida, desarrollar repentinamente hepatitis alcohólica aguda. Similarmente, la obesidad, la diabetes tipo 2 y la hipertrigliceridemia se asocian frecuentemente con la acumulación hepática de grasa y, aunque esta situación no conduce invariablemente a la aparición de lesiones necroinflamatorias, estos pacientes tienen mayor riesgo de desarrollar NASH. Consecuentemente, se ha propuesto la existencia de factores ambientales o celulares que actúen como interruptores de una cascada de eventos moleculares que inducen necrosis, inflamación y fibrosis. Dos de estas posibles causas son la endotoxemia portal y la peroxidación lipídica. Asimismo se han identificado alteraciones en la expresión de diversos genes/proteínas, tales como CYP2E1, CYP4A, UCP2, en la NASH y en la ASH, pero ninguno de estos genes tiene valor diagnóstico o predictivo del desarrollo de la enfermedad con el tiempo.

Actualmente, la mayoría de los pacientes con NASH son evaluados a causa de unos resultados de análisis de la función hepática elevados y crónicos (e.g., elevación moderada crónica de aminotransferasas), hepatomegalia o por ambos motivos. La combinación del historial clínico, examen físico, análisis de sangre, exámenes radiológicos e histológicos permite excluir otras causas de enfermedad hepática. El análisis de sangre debe incluir un perfil hepático completo, incluyendo, por ejemplo, el recuento de células sanguíneas y la determinación de anticuerpos anti-HCV, antígeno de superficie de la hepatitis B, índice de hierro, ceruloplasmina, anticuerpo antinuclear, α_1 -antitripsina y anticuerpo antimitocondrial. El diagnóstico por imagen, por ejemplo, mediante ultrasonografía hepática, la modalidad de diagnóstico por imagen preferida, revela la existencia de un hígado "brillante" de ecogenicidad aumentada. No obstante, la sensibilidad y especificidad de esta técnica de diagnóstico por imagen es de un 89%-95% y de un 84%-93%, respectivamente, para la esteatosis. La existencia de un hígado graso también puede ser diagnosticada mediante tomografía computerizada o mediante resonancia magnética

abdominal. A pesar de todo, los datos clínicos, analíticos y radiológicos no permiten diferenciar entre NASH y la hepatitis alcohólica ya que ambas patologías son histológicamente idénticas (presencia de esteatosis macrovesicular difusa o centrilobular, hepatocitos inflados, necrosis, infiltrado inflamatorio lobular mixto, con o sin fibrosis, cuerpos de Mallory, lipogranulomas y núcleos glicogenazos). Por tanto, el diagnóstico de NASH sólo se confirma en casos de ausencia de consumo significativo de alcohol (típicamente menos de 20-40 g alcohol/día). Los marcadores moleculares que se han propuesto hasta la fecha (CYP2E1, CYP4A, UCP2) no tienen valor diagnóstico o predictivo del desarrollo de la enfermedad con el tiempo.

10 Existe, por tanto, la necesidad de disponer de herramientas que permitan estudiar la progresión de NASH a lo largo del tiempo e identificar marcadores moleculares asociados con NASH. Este tipo de herramientas podría ser un modelo animal que permitiera analizar el perfil de expresión de genes y proteínas en hígado normal y en hígado con NASH, así como durante la progresión de la enfermedad con el tiempo. La
15 identificación de dichos marcadores moleculares, en particular, marcadores moleculares tempranos, con valor diagnóstico y predictivo de NASH, y el estudio de sus efectos funcionales, ayudaría en la prevención y/o tratamiento de la NASH así como en la búsqueda y desarrollo de fármacos útiles para el tratamiento, preventivo y/o curativo, de NASH. Un buen marcador molecular de NASH sería aquél que apareciera tempranamente en el hígado,
20 mucho antes de que se observaran alteraciones histológicas. Idealmente, para diagnosticar con eficiencia el riesgo a padecer NASH se debería disponer, más que de un único marcador molecular, de un conjunto de marcadores moleculares tempranos de la aparición de NASH, que constituyeran algo así como la "huella molecular" temprana de la enfermedad.

25 En esa línea de experimentación, se ha desarrollado un modelo para el estudio *in vivo* de NASH. Se trata de un ratón knockout deficiente en el gen *MAT1A*, es decir, en la síntesis de S-adenosilmetionina (AdoMet) en hígado, un metabolito esencial en las células, al que se le ha denominado MATO (Lu S.C., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001; 98:5560-5565). Estos ratones MATO desarrollan espontáneamente, además de NASH,
30 estrés oxidativo y carcinoma hepatocelular (Martínez-Chantar M.L., *et al.*, Faseb J., 2002, 16:1292-1294). El gen *MAT1A* se expresa específicamente en el hígado adulto, aunque se ha demostrado que la expresión de ese gen se encuentra silenciada en pacientes con cirrosis

hepática (tanto de origen alcohólico como no alcohólico). A los 3 meses de edad, el hígado de los ratones MATO es normal pero es mucho más susceptible de desarrollar esteatosis macrovesicular severa (inducida por una dieta deficiente en colina) y necrosis (inducida por CCl₄); a los 8 meses de edad desarrollan espontáneamente NASH; y a los 14-18 meses de edad tienen un elevado riesgo de desarrollar carcinoma hepatocelular (más del 80% de los animales desarrollan tumores hepáticos). Experimentos preliminares de DNA microarray (Lu S.C., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001; 98:5560-5565) indican que a los 3 meses de edad (cuando la histología del hígado es aún normal) ya existen cientos de diferencias en la expresión de genes y proteínas entre los ratones normales o tipo salvaje (WT) y los ratones MATO. Es decir, mucho antes de observarse una lesión histológica en el hígado, la enfermedad hepática ya se ha iniciado a nivel molecular, aunque muchas de dichas diferencias no se mantienen durante la progresión de la enfermedad.

COMPENDIO DE LA INVENCIÓN

Un objetivo de esta invención consiste en el desarrollo de un método para el diagnóstico de NASH basado en el análisis de los perfiles de expresión en hígado de unas proteínas concretas que actúan como marcadores moleculares de dicha enfermedad.

Para identificar los marcadores moleculares de NASH y obtener la huella molecular de dicha enfermedad, los inventores han analizado la expresión diferencial de proteínas mediante técnicas de proteómica (electroforesis bidimensional e identificación de las proteínas diferencialmente expresadas mediante espectrometría de masas) en muestras de hígado de ratones WT y MATO [ratones mutantes knockout deficientes en el gen *MAT1A* (*MAT1A*^{-/-}) (Lu S.C., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001; 98:5560-5565)] a lo largo del tiempo (1 y 15 días, 3 y 8 meses de edad) hasta la aparición de NASH. Dichos ratones mutantes MATO se eligieron porque podían utilizarse para estudiar la aparición de marcadores moleculares de NASH antes de que la enfermedad se hiciera evidente a nivel histológico.

Todos los ratones fueron tratados con una dieta normal. La aparición y evolución de NASH se siguió mediante control histológico. El análisis de esta información ha permitido identificar unas proteínas cuya expresión se encuentra alterada, bien aumentada o bien disminuida, desde el primer día después del nacimiento de un sujeto susceptible de desarrollar NASH hasta la aparición de NASH. Estas proteínas, útiles como marcadores

moleculares de NASH, son las siguientes: apolipoproteína A1, subunidad β de la ATPasa mitocondrial, leucotrieno A4 hidrolasa, keratina 18, guanidina acetato N-metiltransferasa, superóxido dismutasa, albúmina, proteína antioxidante 2 (isoforma 1), prohibitina 1, metionina adenosil transferasa, acil CoA deshidrogenasa de cadena larga, proteína de unión
 5 al selenio y proteína antioxidante 2 (isoforma 2). Las proteínas apolipoproteína A1, subunidad β de la ATPasa mitocondrial, leucotrieno A4 hidrolasa, keratina 18, guanidina acetato N-metiltransferasa, superóxido dismutasa, albúmina y proteína antioxidante 2 (isoforma 1), aumentan su expresión en el hígado, mientras que las proteínas prohibitina 1, metionina adenosil transferasa, acil CoA deshidrogenasa de cadena larga, proteína de
 10 unión al selenio y proteína antioxidante 2 (isoforma 2) disminuyen su expresión en el hígado, meses antes de la aparición de NASH en el hígado de ratones MATO. Estas proteínas pueden utilizarse como marcadores moleculares del riesgo a desarrollar la NASH, bien de forma aislada o combinada, considerando el perfil de expresión de la totalidad o de una parte de dichas proteínas, para determinar la huella molecular de NASH.

15 La apolipoproteína A1 (APA1) es el componente proteico de una lipoproteína que transporta lípidos en la sangre. Se han descrito variaciones en los niveles de APA1 asociados a la fibrosis hepática [Teare J.P., *et al.*, Lancet (North American Edition), 1993, 342:895-898].

La subunidad β de la ATPasa (ATPB) mitocondrial es un componente de la ATPasa
 20 (o ATP sintasa) mitocondrial, enzima que cataliza la síntesis de ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico en mitocondrias utilizando la energía derivada de un gradiente de protones.

La leucotrieno A4 hidrolasa o LKHA es una enzima implicada en la biosíntesis de leucotrienos y es un marcador de la inflamación en general [Eberhard J., 2002, Virchows
 25 Archiv, 440(6):627-634].

Se ha descrito que tanto en la NASH como en la ASH existe una alteración en la relación keratina 18/keratina 8 [Denk H., *et al.*, Der Pathologe, 2001, 22(6):388-398]. Además, los niveles de keratina 18 (K1CR) son indicadores de otras enfermedades hepáticas, tales como el carcinoma hepático, la hepatitis crónica, la hepatitis alcohólica y
 30 la cirrosis criptogénica Caulin C., Journal of Cell Biology, 2000, 149(1):17-22; Toivola D.M., *et al.*, Experimental Cell Research, 2000, 255(2):156-170; Stumptner C., *et al.*, Hepatology, 1997, 26(4, parte 2):194A; Ku Nam-On, *et al.*, Journal of Clinical

Investigation, 1997, 99(1):19-23].

La guanidina acetato N-metiltransferasa (GAMT) es una proteína implicada en el último paso de la biosíntesis de creatinina. La superóxido dismutasa (SODC) es una proteína que destruye radicales tóxicos para las células. La albúmina (ALBU) es una
 5 proteína de bajo peso molecular soluble en soluciones salinas diluidas y en agua con capacidad para unir agua, iones (sodio, potasio o calcio), ácidos grasos, hormonas, etc. La proteína antioxidante 2 (AOP2) protege frente al daño oxidativo. La metionina adenosil transferasa (MAT) cataliza la formación de AdoMet a partir de metionina y ATP. La acil CoA deshidrogenasa de cadena larga (ACDL) es una enzima implicada en el sistema de la
 10 beta-oxidación de los ácidos grasos mitocondrial. La proteína de unión al selenio (SBP) une selenio y acetaminofeno.

La prohibitina 1 (PHB1) es una proteína asociada a la membrana interna de la mitocondria, cuya función se ha relacionado con el plegamiento y estabilización de proteínas implicadas en la respiración mitocondrial. La deficiencia en PHB1 se ha asociado
 15 con una alteración de la función de la mitocondria y a un envejecimiento prematuro. Se ha descrito su relación con el cáncer de hígado [Seow T.K., *et al.*, Electrophoresis, 2000, 21(9):1787-1813].

No se ha establecido previamente ninguna relación entre la expresión de dichas proteínas y el desarrollo de NASH, por lo que ha resultado sorprendente su empleo como
 20 marcadores moleculares de dicha enfermedad y como huella molecular de la misma.

Por tanto, un aspecto de esta invención lo constituye un método para la recogida de datos que permita el diagnóstico precoz de NASH o su confirmación, que comprende detectar y cuantificar *in vitro*, en una muestra de tejido hepático procedente de un sujeto, los niveles (concentración) de una proteína seleccionada entre apolipoproteína A1,
 25 subunidad β de la ATPasa mitocondrial, leucotrieno A4 hidrolasa, keratina 18, guanidina acetato N-metiltransferasa, superóxido dismutasa, albúmina, proteína antioxidante 2 (isoforma 1), prohibitina 1, metionina adenosil transferasa, acil CoA deshidrogenasa de cadena larga, proteína de unión al selenio, proteína antioxidante 2 (isoforma 2), y combinaciones de las mismas, y comparar los resultados obtenidos con los valores
 30 normales, de referencia, de dichas proteínas en tejido hepático obtenidos a partir de hígados sanos. En una realización particular, dicha proteína se selecciona entre apolipoproteína A1, subunidad β de la ATPasa mitocondrial, leucotrieno A4 hidrolasa, keratina 18, prohibitina

1 y combinaciones de las mismas.

El método proporcionado por esta invención permite evaluar, de forma sencilla y fiable, el riesgo potencial de un sujeto a desarrollar NASH. Dicho sujeto puede ser un sujeto al que no se le ha diagnosticado previamente NASH, o bien un sujeto al que se le ha
5 diagnosticado NASH pero que se desea confirmar dicho diagnóstico. Por tanto, en una realización particular dicho método permite evaluar la predisposición (diagnóstico precoz o pronóstico) de un sujeto a desarrollar NASH, mientras que en otra realización particular, dicho método permite confirmar (diagnosticar) la existencia de NASH en un sujeto.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de una proteína
10 seleccionada entre apolipoproteína A1, subunidad β de la ATPasa mitocondrial, leucotrieno A4 hidrolasa, keratina 18, guanidina acetato N-metiltransferasa, superóxido dismutasa, albúmina, proteína antioxidante 2 (isoforma 1), prohibitina 1, metionina adenosil transferasa, acil CoA deshidrogenasa de cadena larga, proteína de unión al selenio, proteína antioxidante 2 (isoforma 2), y sus combinaciones, en un método *in vitro* para diagnosticar
15 NASH, o para evaluar la predisposición de un sujeto a desarrollar NASH.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 recoge la relación de las proteínas expresadas de forma diferencial en el hígado de ratones mutantes *MAT1A*^{-/-} durante la progresión de NASH. Extractos
20 hepáticos de ratones WT y *MAT1A*^{-/-} de 1, 15, 90 y 240 días de edad fueron analizados mediante electroforesis bidimensional. Las proteínas expresadas diferencialmente fueron identificadas mediante espectrometría de masas MALDI TOFF y se agruparon en base a los procesos biológicos en los que están implicadas según los criterios de Ontología de Genes: (1) Comunicación celular; (2) Crecimiento celular y/o mantenimiento; (3) Procesos de
25 desarrollo.

La Figura 2 es un panel que ilustra las alteraciones metabólicas en el hígado de ratones mutantes *MAT1A*^{-/-} durante la progresión de NASH. Las enzimas metabólicas cuya expresión aumentaba o disminuía en el hígado de ratones mutantes *MAT1A*^{-/-} de 1, 15, 90 y 240 días de edad fueron mapeadas en el panel "Biochemical Pathways" de Boehringer
30 Mannheim (<http://www.expasy.org>) utilizando el programa GARBAN desarrollado en la Universidad de Navarra.

La Figura 3A muestra los resultados de un análisis Western blot, en concreto,

muestra los niveles hepáticos de PHB1, COX I, COX II, ATPB, en estado estacionario, en el hígado de ratones WT y *MAT1A*^{-/-}. Extractos de hígado (15 µg/calle) de ratones de 1 a 240 días de edad fueron analizados mediante Western blot. Para asegurarse de que la carga era la misma se efectuó una tinción de las membranas con Rojo-Ponceau. La Figura 3B muestra los resultados de un análisis Northern blot, en concreto de la expresión de PHB1, COX II, ATPB, y rRNA 16S en hígados de ratones WT y *MAT1A*^{-/-}. Las muestras de RNA de hígado (30 µg/calle) de ratones de 90 días de edad fueron analizadas mediante un análisis de hibridación Northern blot utilizando sondas específicas. Las membranas se hibridaron con una sonda para rRNA 18S con el fin de comprobar que las cargas eran iguales. La Figura 3C muestra los resultados de un análisis de Southern, en concreto de DNA mitocondrial en ratones *MAT1A*^{-/-} respecto a ratones WT. DNA total fue aislado de ratones de 3 meses de edad, escindido con *EcoRI* y utilizado en un análisis Southern con una sonda específica para COX II. Cantidades equivalentes de DNA en cada calle fueron aseguradas mediante tinción del gel con bromuro de etidio. Se muestran manchas representativas de 3 experimentos independientes.

La Figura 4 es un diagrama de barras que muestra el potencial de la membrana interna de la mitocondria. La funcionalidad de la membrana fue estudiada mediante la medida de dicho gradiente en un fracción mitocondrial enriquecida de hígados de ratones WT y *MAT1A*^{-/-} de 3 meses. El valor del 100% fue $175,51 \pm 6,69$ unidades de fluorescencia/mg proteína. Se representa la media de tres experimentos.

La Figura 5 ilustra la regulación de los niveles de PHB1 por AdoMet en hepatocitos de rata en cultivo. Los niveles de PHB1 fueron medidos en hepatocitos de rata en cultivo durante 12 ó 24 horas en presencia o ausencia de metionina 100 µM, AdoMet 4 mM o cicloleucina 20 mM. Extractos de hígado (15 µg/calle) fueron analizados mediante Western blot utilizando anticuerpos específicos. Para asegurarse de que la carga era la misma se efectuó una tinción de las membranas con Rojo-Ponceau. Cada mancha mostrada es representativa de 3 experimentos independientes.

La Figura 6A muestra los niveles hepáticos de PHB1, COX I y COX II, en estado estacionario, en el hígado de ratones WT y *ob/ob*. Cada mancha mostrada es representativa de 3 experimentos independientes. La Figura 6B muestra los niveles hepáticos de PHB1 y COX I, en estado estacionario, en el hígado de pacientes control y obesos. Extractos de hígado (15 µg/calle) fueron analizados mediante Western blot utilizando anticuerpos

específicos. Para asegurarse de que la carga era la misma se efectuó una tinción de las membranas con Rojo-Ponceau.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

5 En un aspecto, la invención se relaciona con un método *in vitro* para diagnosticar NASH, o para evaluar la predisposición de un sujeto a desarrollar NASH. Un método como el proporcionado por esta invención permite evaluar la predisposición o riesgo de un sujeto a desarrollar NASH, es decir, permite determinar aquéllos sujetos que, dentro de un grupo o población de sujetos, presentan un mayor riesgo a desarrollar NASH. A modo ilustrativo,
10 se puede analizar un sujeto al que previamente no se le ha diagnosticado NASH, o que carece de síntomas, con el fin de obtener información sobre la posibilidad de que dicho sujeto desarrolle NASH en un futuro.

Asimismo, dicho método puede utilizarse tanto con fines de diagnóstico (método de diagnóstico) como con fines de pronóstico (método de pronóstico). Un método de
15 diagnóstico se refiere a un ensayo realizado sobre un sujeto que presenta síntomas que podrían ser de NASH. Un método de pronóstico se refiere a un método que ayuda a predecir, al menos en parte, el curso de la enfermedad. En este sentido, se puede analizar un sujeto al que se le ha diagnosticado previamente NASH para conocer el progreso de la enfermedad, así como la posibilidad de que responda favorablemente a un tratamiento
20 terapéutico concreto.

El término "sujeto" tal como se utiliza en la presente invención incluye seres humanos y animales, por ejemplo, mamíferos. En una realización particular dichos sujetos son seres humanos, hembras o machos, de cualquier edad o raza.

El término "esteatohepatitis no alcohólica" o "NASH" se utiliza en el sentido
25 actualmente admitido por la comunidad científica.

De forma más concreta, la invención proporciona un método que comprende:

- a) recoger una muestra de tejido hepático de un sujeto;
- b) detectar y cuantificar en dicha muestra de tejido hepático el nivel de una proteína seleccionada entre apolipoproteína A1 (APA1), subunidad β de la
30 ATPasa mitocondrial (ATPB), leucotrieno A4 hidrolasa (LKHA), keratina 18 (K1CR), guanidina acetato N-metiltransferasa (GAMT), superóxido dismutasa (SODC), albúmina (ALBU), proteína antioxidante 2 (AOP2) (isoformas 1 y 2),

prohibitina 1 (PHB1), metionina adenosil transferasa (MAT), acil CoA deshidrogenasa de cadena larga (ACDL), proteína de unión al selenio (SBP), y combinaciones de las mismas; y

- 5 c) comparar los resultados obtenidos en la etapa b) con los valores normales, de referencia, para dichas proteínas en tejido hepático.

La muestra de tejido hepático a analizar puede ser una muestra de tejido hepático de cualquier parte del hígado del sujeto cuya predisposición a desarrollar NASH, o diagnosticar NASH, se desea conocer. Dicha muestra de tejido hepático procedente de dicho sujeto puede ser obtenida por cualquier método convencional, por ejemplo, mediante
10 biopsia.

La detección y cuantificación en una muestra de tejido hepático de los niveles (concentración) de dichas proteínas APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU, AOP2 (isoforma 1), AOP2 (isoforma 2), PHB1, MAT, ACDL y/o SBP puede realizarse mediante el empleo de anticuerpos específicos frente a dichas proteínas, mediante técnicas
15 de ELISA o Western blot. Alternativamente, dichas proteínas pueden detectarse y cuantificarse mediante el empleo de dispositivos de tipo biochip o microarray de proteínas que incluyan anticuerpos específicos frente a las proteínas a detectar, por ejemplo, microarrays de detección, que permiten la detección de proteínas diana y su cuantificación (Huang, RP. Detection of multiple proteins in an antibody-based protein microarray system.
20 Journal of Immunological Methods 225 (2001): 1-13). El término "anticuerpo" tal como aquí se utiliza incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos recombinantes de anticuerpos, combibodies, fragmentos Fab y scFv de anticuerpos, así como los dominios de unión a ligando.

Aunque, en principio, bastaría con detectar y cuantificar el nivel de una de dichas
25 proteínas, en la práctica, es preferible, detectar y cuantificar el nivel de dos o más de dichas proteínas, con el fin de obtener la huella molecular del sujeto en lo relativo a su predisposición a desarrollar NASH o a confirmar un diagnóstico de NASH.

Los resultados obtenidos en la etapa b), relativos a la detección y cuantificación de las proteínas APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU, AOP2 (isoforma 1),
30 AOP2 (isoforma 2), PHB1, MAT, ACDL y/o SBP, en la muestra de tejido hepático, se comparan con los valores normales, de referencia, para dichas proteínas en tejido hepático procedente de hígados sanos. Dichos valores normales, de referencia, de dichas proteínas

en tejido hepático pueden obtenerse mediante el análisis y cuantificación de dichas proteínas en muestras de tejido hepático procedentes de hígados normales, es decir, de hígados procedentes de sujetos que no han desarrollado NASH ni ninguna otra enfermedad hepática que pudiera dar lugar a unos valores de referencia inadecuados para dichas proteínas. En general, los incrementos o disminuciones en los niveles de las proteínas marcadoras se estiman mediante la comparación de los resultados obtenidos de los análisis de las muestras correspondientes a los sujetos del ensayo con los resultados de las muestras controles, que se analizan en paralelo. En cada ensayo, cada sujeto se comparará con muestras controles validadas previamente.

10 Cuando la comparación de los resultados obtenidos en la etapa b) con los valores normales, de referencia, indica que:

(i) el nivel (concentración) de, al menos, una de las proteínas APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU o AOP2 (isoforma 1), es superior
15 al límite superior de los valores normales, de referencia, para dichas proteínas en tejido hepático; y/o

(ii) el nivel (concentración) de, al menos, una de las proteínas PHB1, AOP2 (isoforma 2), MAT, ACDL o SBP es inferior al límite inferior de los
20 valores normales, de referencia, para dichas proteínas en tejido hepático,

entonces, dichos resultados son indicativos de la existencia de NASH en el sujeto cuya muestra de tejido hepático ha sido ensayada o bien de la existencia de una predisposición o riesgo elevado de dicho sujeto a desarrollar NASH en un futuro.

25 Un método como el descrito previamente permite obtener datos que permiten el diagnóstico precoz de NASH o su confirmación.

En una realización particular y preferida del método proporcionado por esta invención, la proteína marcadora de NASH se selecciona entre APA1, ATPB, LKHA, K1CR, PHB1 y combinaciones de las mismas. En este caso, un nivel (concentración) de,
30 al menos, una de las proteínas APA1, ATPB, LKHA o K1CR, superior al límite superior de los valores normales, de referencia, para dichas proteínas en tejido hepático, y/o un nivel (concentración) de PHB1 inferior al límite inferior de los valores normales, de referencia,

para dicha proteína en tejido hepático, es indicativo de la existencia de NASH en el sujeto cuya muestra de tejido hepático ha sido ensayada o bien de la existencia de una predisposición o riesgo elevado de dicho sujeto a desarrollar NASH en un futuro. Aunque, en principio, bastaría con detectar y cuantificar el nivel de una de dichas proteínas, en la práctica es recomendable detectar y cuantificar el nivel de, al menos, dos de ellas, preferentemente, tres, más preferentemente, cuatro y, aún más preferentemente, los niveles de las cinco proteínas mencionadas ya que ello permitiría obtener la huella molecular del sujeto en lo relativo a su predisposición a desarrollar NASH o a confirmar un diagnóstico de NASH.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de una proteína seleccionada entre APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU, AOP2 (isoforma 1), AOP2 (isoforma 2), PHB1, MAT, ACDL, SBP y/o sus combinaciones, preferentemente, entre APA1, ATPB, LKHA, K1CR, PHB1, y/o sus combinaciones, en un método *in vitro* para diagnosticar NASH, o para evaluar la predisposición de un sujeto a desarrollar NASH.

El siguiente Ejemplo sirve para ilustrar la invención y no debe ser considerado en sentido limitativo de la misma.

EJEMPLO 1

Análisis proteómico funcional de la esteatohepatitis no alcohólica (NASH)

Se han investigado los mecanismos moleculares implicados en la progresión de NASH en el hígado de ratones *MAT1A*^{-/-} mediante una aproximación proteómica de alto rendimiento.

1. Materiales y métodos

25

1.1 Materiales

Los anticuerpos anti-citocromo c oxidasa subunidades I y II eran de Molecular Probes. El anticuerpo anti-prohibitina 1 era de Calbiochem. El anticuerpo anti-subunidad β de la ATP sintasa de mitocondria era de Molecular Probes. Los reactivos de electroforesis eran de Bio-Rad. La tripsina, de Promega; la urea y la colagenasa, de Gibco BRL; y la tiourea, de Merck. El resto de los reactivos químicos era de Sigma.

Los animales [ratones tipo salvaje (WT) y mutantes knockout deficientes en el gen

MATIA (*MATIA*^{-/-}) o ratones MATO (Lu S.C., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001; 98:5560-5565)] procedían de la colonia endogámica de los propios solicitantes y fueron tratados de forma humanitaria de acuerdo con las guías institucionales de los solicitantes. Los ratones *ob/ob* se adquirieron a Jackson Laboratories (Bar Harbor, MI). Las muestras humanas fueron obtenidas en el Hospital Príncipe de Asturias, cuyo comité para la supervisión de investigación humana aprobó este estudio.

1.2 Métodos

Análisis proteómico de alto rendimiento

Las muestras de hígado fueron homogeneizadas en 20 volúmenes de tampón de lisis que contenía urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 4%, DTT 1% y 3-10 anfolitos Bio-Lyte 0,5%. Los homogeneizados fueron centrifugados a 100,000 x g durante 45 minutos a 15°C. La concentración de proteína fue determinada en los sobrenadantes mediante el empleo del kit de ensayo Bradford (Bio-Rad) utilizando albúmina diluida en tampón de ruptura como patrón. La primera separación, por isoelectroenfoque, se realizó en una célula Protean IEF (Bio-Rad) utilizando tiras de 17 cm ReadyStrips IPG con diferentes intervalos de pH. Las muestras (300-700 µg de proteína) se cargaron y se realizó una rehidratación activa durante 12 h a 50 V y 20°C. Los geles se corrieron a 60.000 Vh utilizando un protocolo de aumento progresivo desarrollado por el fabricante. Las tiras IPG fueron equilibradas en Tris/HCl 50 mM, pH 7,5, urea 6 M, glicerol 30%, SDS 2% y DTT 2% e incubadas en el mismo tampón conteniendo 2,5% de yodoacetamida y azul bromofenol, en ausencia de DTT. Las tiras IPG fueron cargadas directamente en geles de poliacrilamida al 12,5% (18 cm x 20 cm x 1 mm) y sellados con agarosa de bajo punto de fusión. Los geles de la segunda separación, por SDS-PAGE, se corrieron durante 15 h. Los geles fueron teñidos con Phastgel Blue R preparado en agua (65%), etanol (25%) y ácido acético (10%). Alternativamente, se tiñeron con plata utilizando el kit de tinción con plata de Amersham. Las imágenes fueron digitalizadas con un "Imaging Densitometer" de Bio-Rad y analizadas utilizando el programa PDQuest. Se detectaron diferencias cualitativas y cuantitativas pero únicamente fueron aceptadas cuando eran confirmadas, al menos, dos veces, en 5 experimentos independientes. Las manchas de los geles correspondientes a proteínas expresadas de forma diferencial se recogieron de forma manual y se procesaron en una estación MassPrep de Micromass. Los especímenes del gel se destiñeron con bicarbonato amónico 50mM y

acetronitrilo 50% (geles teñidos con Coomasie) o con ferricianuro potásico 15 mM y tiosulfato sódico 50 mM (geles teñidos con plata). A continuación, las proteínas se redujeron con DTT 10 mM en bicarbonato amónico 100 mM y fueron alquiladas con yodoacetamida 55 mM en el mismo tampón. Posteriormente se realizó una digestión de las

5 proteínas en el mismo gel con tripsina 6 ng/μl en bicarbonato amónico 50 mM, durante 5 h a 37°C. Los péptidos resultantes se extrajeron con ácido fórmico 1% y acetronitrilo 2%. Finalmente, 2 μl de muestra se mezclaron con 2 μl de una disolución saturada de ácido α-ciano-4-hidroxi-transcinámico en TFA al 0,1%, acetronitrilo al 50% y, a continuación, fueron depositados en una placa diana MALDI. Los fragmentos de la digestión con tripsina

10 fueron analizados en un espectrómetro de masas MALDI TOFF GL-REF de Micromass. El procesamiento de los datos se llevó a cabo con MassLynx y las bases de datos de búsqueda (SWISSPROT, TREMBL, ENSEMBL) para identificar las proteínas de interés a partir de su huella dactilar peptídica se realizó con ProteinLynx Global Server (Micromass). El análisis de datos y su agrupamiento se realizó con GARBAN (no

15 publicado).

Aislamiento y cultivo de hepatocitos de rata

Los hepatocitos fueron aislados de ratas Wistar masculinas (200-250 g) mediante perfusión con colagenasas, tal como se ha descrito previamente (Avila, M.A., *et al.*,

20 Gastroenterology, 1998, 114:364-371). Una vez aislados, los hepatocitos se cultivaron de acuerdo con García-Trevijano y col. (García-Trevijano, E.R., *et al.*, Faseb J, 2000, 14:2511-2518) en presencia o ausencia de metionina 100 μM, AdoMet 4 mM o cicloleucina (CL) 20 mM durante los períodos indicados de tiempo. La viabilidad celular fue medida mediante exclusión de azul de tripano, no observándose diferencias significativas en ningún

25 momento entre los controles y ninguno de los diversos tratamientos llevados a cabo en este estudio.

Aislamiento mitocondrial y caracterización

Se obtuvo una fracción mitocondrial enriquecida a partir de 100 mg de especímenes

30 de hígado con el kit de aislamiento de mitocondrias (Mitochondria Isolation Kit) de Sigma. El gradiente electroquímico de protón ($\Delta\psi$) de la membrana interna mitocondrial fue analizado midiendo la captación del colorante fluorescente carbocianina JC-1 en el interior

de la mitocondria, siguiendo el procedimiento indicado por el fabricante. Las mediciones de fluorescencia se hicieron utilizando un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 50 B.

Aislamiento de RNA y análisis de hibridación Northern

5 El RNA de hígado total fue aislado mediante el empleo del método del tiocianato de guanidinio (García-Trevijano, E.R., *et al.*, Faseb J, 2000, 14:2511-2518). La concentración de RNA fue determinada espectrofotométricamente antes de su uso, y su integridad se comprobó mediante electroforesis con posterior tinción con bromuro de etidio. La electroforesis y la transferencia al gel se realizaron siguiendo un protocolo
10 descrito previamente (Lu, S.C., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001; 98:5560-5565). El cDNA de la prohibitina 1 fue clonado mediante transcripción inversa-reacción en cadena de la polimerasa a partir de hígado de ratón. Se utilizaron el sistema de preamplificación Superscript (Life Technologies), la enzima Taq Long plus (Stratagene) y los iniciadores sentido 5'-atggctgccaagtggttgagtc-3' y antisentido 5'-tcactggggaagctggagaagc-3'. Se han
15 descrito sondas para la subunidad β de la ATPasa y para las subunidades I y II de la citocromo oxidasa (Izquierdo & Cuezva, Mol. Cell. Biob, 1997, 17:5255-5268; Otero, G., *et al.*, Carcinogenesis, 1997, 18:1569-1575). Los análisis de hibridación Northern fueron realizados sobre RNA total utilizando procedimientos convencionales (Lu S.C., *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001; 98:5560-5565). Todas las sondas fueron marcadas con
20 [32 P]dCTP utilizando el sistema Rediprime DNA Labeling System de Amersham. Para asegurar la carga igual de las muestras de RNA, las membranas también fueron hibridadas con una sonda marcada con 32 P rRNA 8S. Se utilizaron autoradiografía y densitometría para cuantificar el RNA relativo. Los resultados del análisis Northern blot se normalizaron a 18S rRNA.

25

Aislamiento de DNA y análisis Sourthern blot

El DNA total fue extraído a partir de hígados de ratones de 3 meses de edad WT y MAT1A^{-/-}, tal como se ha descrito previamente (34). El DNA celular total (20 μ g) fue digerido con EcoRI. El DNA digerido fue resuelto sobre gel de agarosa al 1%, transferido
30 y fijado a membranas de nylon. Las membranas fueron incubadas con una sonda de COX II marcada con [32 P] dCTP. Las condiciones para la hibridación y lavado de la membrana fueron las descritas anteriormente (Otero, G., *et al.*, Carcinogenesis, 1997, 18:1569-1575).

Análisis Western Blot

La extracción de proteína y el análisis "western blotting" se realizaron tal como se ha descrito anteriormente (Avila, M.A., *et al.*, Oncogene, 1995, 10:963-971; Ruiz, F., *et al.*, Hepatology, 1998, 28:1051-1057). Brevemente, cantidades iguales de proteína (15 µg) fueron resueltas en geles SDS-poliacrilamida al 12,5%. Las proteínas fueron transferidas electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron sondeadas con anti-MAT (Ruiz, F., *et al.*, Hepatology, 1998, 28:1051-1057), anti-PHB1, anti-ATPasa β y anti-COX I y II. Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa de rábano. Los blots fueron revelados mediante quimioluminiscencia (Dupont).

2. Resultados

Huella dactilar proteómica de la patogénesis de NASH en ratones *MAT1A*^{-/-}

Se han investigado los mecanismos moleculares implicados en la progresión de NASH en el hígado de ratones *MAT1A*^{-/-} mediante una aproximación proteómica de alto rendimiento. Se han obtenido patrones de expresión de proteínas mediante análisis bidimensional de extractos de hígado de ratones WT y *MAT1A*^{-/-} de 1, 15, 90 y 240 días de edad. Se realizaron cinco experimentos independientes utilizando extractos de hígado de distintos animales. En base a los resultados del análisis de imagen con PDQuest (BioRad), se visualizaron una media de 1.500 a 2.000 manchas dependiendo del procedimiento de tinción del gel. Las imágenes de los geles de los ratones WT y *MAT1A*^{-/-} fueron comparadas para determinar las diferencias en la expresión de proteínas, aceptándose únicamente aquéllos cambios en los que se confirmaba un aumento del doble, o una reducción a la mitad, en los 5 experimentos.

El análisis reveló que tan solo 1 día después del nacimiento, ya se habían inducido 140 diferencias en el hígado de los ratones *MAT1A*^{-/-} y que los cambios se acumulaban con la edad (242, 259 y 297 cambios a los 15, 90 y 240 días respectivamente). La distribución entre las proteínas que aumentan su expresión y las proteínas que disminuyen su expresión se mantiene hasta 3 meses, el 53%-70% de las proteínas aumentaron su expresión y el 30%-47% disminuyeron su expresión. En contraste, este perfil cambia en hígados de ratones mutantes *MAT1A*^{-/-} de 8 meses de edad, cuando el NASH ya está desarrollado, en donde el 27% eran proteínas que aumentaban su expresión y el 73% proteínas que disminuían su

expresión. De todos los cambios iniciales, sólo las proteínas más abundantes representadas en las bases de datos fueron identificadas mediante huella dactilar de masa de péptidos, dando como resultado 117 proteínas identificadas con éxito.

Se ha encontrado una correlación lineal entre M_r y pI calculados a partir de la
 5 secuencia de las proteínas identificadas y el R_f experimental de la mancha correspondiente, calculada a partir de los geles bidimensionales (datos no mostrados). Este descubrimiento valida aún más la identidad de las manchas analizadas. Se observaron algunas desviaciones del pI respecto a la linealidad, lo que es probablemente debido a modificaciones post-traducción.

10 El perfil de expresión proteica específico de hígados de ratones *MAT1A*^{-/-} proporciona una huella proteómica de NASH. Las proteínas de expresión aumentada o disminuida fueron clasificadas según los procesos biológicos en los que están implicadas de acuerdo con los criterios de Ontología Genética (Gene Ontology) y fueron representadas tal como se muestra en la Figura 1. La mayoría de las proteínas expresadas de forma
 15 diferencial en el hígado de los ratones mutantes *MAT1A*^{-/-} se agrupaban en tres procesos biológicos: comunicación celular (grupo 1), crecimiento celular y/o mantenimiento (grupo 2) y procesos de desarrollo (grupo 3) (Figura 1). Algunas de las proteínas identificadas en estos grupos están implicadas en la embriogénesis, morfogénesis y envejecimiento, tales como la cadena 6 de la tubulina α , la cadena 5 de la tubulina α , la actina y la prohibitina
 20 1 (PHB1), que controla la síntesis de DNA y regula la proliferación celular. Asimismo, proteínas implicadas en respuestas a estrés, tales como la hidrolasa leucotrieno A4 (LKHA), aumentaban su expresión. También se identificaron cambios en el perfil de expresión de proteínas implicadas en el estrés oxidativo, por ejemplo, glutatión peroxidasa, proteínas antioxidantes 1 y 2 (AOP2) o superóxido dismutasa Cu^{++}/Zn^{++} (SODC). Finalmente, de
 25 acuerdo con la amplia actividad metabólica del hígado, el 80% de las proteínas cuya expresión cambia en ratones mutantes *MAT1A*^{-/-}, corresponde a proteínas metabólicas. La mayoría de las alteraciones afectan al metabolismo de carbohidratos y aminoácidos. Por ejemplo, la fructosa 1,6-bifosfatasa (aumentaba su expresión) y la glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (disminuía su expresión), enzimas clave en la gluconeogenesis y glucolisis
 30 respectivamente. La acil CoA deshidrogenasa de cadena larga específica (ACDL) y la delta 3,5 delta 2,4 dienoil CoA isomerasa (ambas disminuían su expresión) están implicadas en la beta-oxidación de ácidos grasos. La apolipoproteína A1 (APA1) (aumentaba su

expresión) y la farnesil pirofosfato sintetasa (disminuía su expresión) participan en el transporte y biosíntesis de colesterol, respectivamente; y la malato deshidrogenasa e isocitrato deshidrogenasa (ambas disminuían su expresión) catalizan dos etapas del ciclo del citrato. Asimismo, se identificaron diferencias importantes que afectan al metabolismo de aminoácidos ramificados, aromáticos y con azufre (Figura 2).

Un grupo de 12 proteínas cambiaron su perfil de expresión tan solo 1 día después del nacimiento y mantuvieron esa alteración a lo largo de la progresión de NASH en hígado de ratones *MAT1A*^{-/-} (Figura 1). Estas proteínas, que pueden ser consideradas como marcadores tempranos de NASH, fueron identificadas como APA1, LKHA, proteína de unión a selenio (SBP), AOP2, MAT, keratina 18 tipo 1 citoesquelética (K1CR), guanidinoacetato metiltransferasa (GAMT), PHB1, SODC, albúmina, ACDL y la subunidad β de la ATPasa mitocondrial (ATPB). La mayoría de estas proteínas son enzimas metabólicas o participan en la respuesta antioxidante de los hepatocitos de los ratones mutantes *MAT1A*^{-/-}. De forma interesante, la PHB1 y ATPB son proteínas mitocondriales, por lo que cambios en su expresión pueden comprometer la función mitocondrial.

AdoMet regula una red de proteínas mitocondriales y la función mitocondrial

La alteración de la función mitocondrial puede ser un factor clave en la progresión de NASH en ratones *MAT1A*^{-/-}. El aumento en la expresión (450%) de la ATPB y la disminución en la expresión (53%) de PHB1 fueron confirmados mediante análisis "western blot" utilizando anticuerpos específicos (Figura 3A). Asimismo, los niveles de estado estacionario de las subunidades I y II de la citocromo c oxidasa (COX) fueron también reducidos en hígado de ratones mutantes *MAT1A*^{-/-} (55% y 53% respectivamente). Estas alteraciones no fueron observadas en otros tejidos (no mostrados). La expresión de genes codificantes de estas proteínas también fue investigada mediante análisis Northern blot. El nivel de mRNA de la ATPB aumenta el doble en hígado de ratones *MAT1A*^{-/-} (Figura 3B). Por el contrario, los niveles de mRNA de PHB1 y COX II, así como de rRNA 16S, fueron similares a los encontrados en los animales WT (Figura 3B). Estas observaciones indican que la disminución de la expresión de las subunidades PHB1 y COX mediante AdoMet implica mecanismos post-traducción. Mientras que PHB1 es el producto de un gen nuclear, las subunidades COX están codificadas por genes mitocondriales. Adicionalmente, no se observaron cambios en el contenido de DNA mitocondrial en hígado

de ratones *MAT1A*^{-/-} (Figura 3C). Cambios en el perfil de expresión de las proteínas PHB1, COX y ATPB sugieren una deficiencia en la respiración mitocondrial.

El potencial de la membrana interna mitocondrial fue medido en una fracción mitocondrial enriquecida purificada a partir de extractos de hígado de ratones WT y *MAT1A*^{-/-}. Se observó una reducción de un 40% en el gradiente electroquímico de protón en los extractos de hígado de los ratones mutantes *MAT1A*^{-/-} (Figura 4), indicando una deficiencia en la integridad de la membrana interna mitocondrial.

Regulación de PHB1 por AdoMet

Se ha investigado si AdoMet regula los niveles de PHB1 en hepatocitos de rata cultivados. En presencia de metionina o AdoMet en medios de cultivo, no se detectó ningún efecto en los niveles de proteína PHB1 después de 24 h de incubación bajo condiciones estándar (Figura 5). Sin embargo, se apreció una disminución de la síntesis de AdoMet mediante restricción de metionina o adición al medio de cultivo de CL, un conocido inhibidor de la actividad MAT, dando como resultado una disminución en la expresión de PHB1 (53% y 55% respectivamente) (Figura 5). La restauración del conjunto intracelular del hepatocito de AdoMet mediante adición exógena de este compuesto después de 12 h de cultivo en ausencia de metionina evitó la caída de PHB1.

Deficiencia en AdoMet y alteraciones mitocondriales en ratones *ob/ob* y en pacientes obesos

Para poder evaluar si las alteraciones observadas en ratones *MAT1A*^{-/-} proporcionan nuevos mecanismos por los que NASH puede ser inducido, se investigaron los niveles de estado estacionario de PHB1 y COX en muestras de hígado de ratones *ob/ob* y pacientes obesos, dos condiciones propensas a desarrollar NASH. Análisis western blot revelaron que PHB1 y COX I, II reducen su expresión en hígado de ratones *ob/ob* (76% y 81% y 70% respectivamente). La disminución en la expresión de PHB1 (53%) y COX I (82%) también fue confirmada en el hígado de pacientes obesos aunque el nivel de COX II era similar al encontrado en hígado de control (Figura 6). De forma similar a la de los ratones *MAT1A*^{-/-}, los niveles de mRNA de PHB y COX I y II en ratones *ob/ob* y en paciente obesos se correlaciona con los niveles encontrados en animales de control (no mostrado).

3. Discusión

AdoMet ha sido generalmente considerado como un metabolito intermediario central implicado en la síntesis de homocisteína y poliaminas así como es el principal donador del grupo metilo celular. Sin embargo, recientes evidencias indican que, además
5 de esta función metabólica central, AdoMet es en el hígado un interruptor de control celular que regula funciones esenciales de hepatocitos tales como proliferación, diferenciación y muerte (Mato, J.M. *et al.*, Faseb J, 2002, 16:15-26). Para comprender mejor los mecanismos por los que estas funciones no tradicionales de AdoMet tienen lugar, se ha estudiado la patogénesis de NASH en ratones mutantes *MAT1A*^{-/-} deficientes en síntesis
10 hepática de AdoMet utilizando un aproximación proteómica de alto rendimiento.

El análisis de los diferentes perfiles de expresión de proteínas en ratones *MAT1A*^{-/-} y WT indica que una deficiencia crónica en la síntesis de AdoMet tiene un efecto pleiotrópico en el hígado que altera funciones hepáticas esenciales. Se han identificado 117 proteínas que se expresan de forma diferencial en el hígado de ratones *MAT1A*^{-/-} durante
15 la progresión de NASH. El análisis global de las diferencias observadas indica un aumento en la expresión de proteínas antioxidantes (SODC, catalasa, glutatión peroxidasa) en el hígado de ratones *MAT1A*^{-/-} que puede reflejar un mecanismo de adaptación para disipar el estrés oxidativo generado por genes oxidantes. Alteraciones metabólicas importantes también se encontraron en el nivel de expresión de proteínas en el hígado de ratones
20 mutantes *MAT1A*^{-/-}. El metabolismo de lípidos, carbohidratos y aminoácidos está dañado en ratones *MAT1A*^{-/-} desde el nacimiento, aunque las diferencias se acumulan durante la progresión de NASH. Estas proteínas que aumentan o disminuyen su expresión proporcionan un perfil proteómico específico que podría explicar algunas de las alteraciones metabólicas reminiscentes a las encontradas en obesidad y otras condiciones
25 asociadas con NASH, que conducen al desarrollo de cirrosis y HCC (Ried, A.E., Gastroenterology, 2001, 121:710-723; Angulo, P., N. Engl. J. Med., 2002, 346:1221-1231; Clark, J.M., *et al.*, Gastroenterolgy, 2002, 122:1649-1657).

El análisis de las 117 proteínas que se expresan de manera diferencial en el hígado de ratones *MAT1A*^{-/-} reveló que la mayoría de los cambios detectados 1 día después del
30 nacimiento no se mantienen durante la progresión de NASH. Estas diferencias dependientes del tiempo pueden reflejar la adaptación del hepatocito a realizar su función biológica normal bajo una deficiencia crónica de AdoMet llevando a la acumulación de alteraciones

que condicionan el desarrollo de la enfermedad. Sin embargo, 12 proteínas cambian su patrón de expresión después del nacimiento, cuando *MAT1A*^{-/-} se activa en ratones WT, y esta alteración se mantiene hasta la aparición de lesiones histológicas. Entre estos cambios tempranos están, el aumento de expresión de las proteínas SODC y AOP2, que ha sido deducido a partir de los geles bidimensionales de acuerdo con evidencias anteriores (Rabilloud, T., et al., J. Biol. Chem., 2002, 277:19396-19401), así como la disminución de la expresión de ACDL y el aumento de la expresión de APA1. Estas alteraciones están de acuerdo con la implicación de estrés oxidativo y metabolismo lipídico anormal en la patogénesis de la enfermedad de hígado graso. Es interesante que 4 proteínas implicadas en la función mitocondrial también han sido identificadas, la ATPB, COX I, COX II y PHB1. El aumento en la expresión de la ATPB ha sido implicado en la maduración mitocondrial y en la transformación neoplásica celular, que es consistente con el estado proliferativo y rediferenciado de hepatocitos *MAT1A*^{-/-}. La disminución en la expresión de COX indica una transferencia deficiente de electrones al oxígeno, la última etapa de la cadena mitocondrial de transferencia de electrones y por ello proporciona una explicación molecular para el estrés oxidativo encontrado en hígados *MAT1A*^{-/-}. La caída de los niveles de estado estacionario de PHB1 puede explicar la disminución en la expresión de COX. PHB1 es el producto de un gen nuclear que está asociado a la membrana interna mitocondrial. Se ha propuesto recientemente que PHB1 es una proteína tipo caperona que participa en el correcto plegamiento y acoplamiento de algunos de los componentes de la cadena respiratoria mitocondrial. De acuerdo con esta hipótesis, una deficiencia en PHB1 puede perjudicar la organización nativa y funcional de proteínas respiratorias que son posteriormente degradadas por proteasas mitocondriales, comprometiendo la funcionalidad mitocondrial. Por ello, el descenso de PHB1 puede inducir una reducción de COX con la pérdida concomitante de la función mitocondrial en hepatocitos *MAT1A*^{-/-}.

La correlación entre una deficiencia en la síntesis de AdoMet y la disminución en la expresión de PHB1 encontrada en ratones *MAT1A*^{-/-} fue confirmada mediante experimentos *in vitro* sobre hepatocitos de rata aislados. La reducción de la síntesis de AdoMet utilizando un medio de cultivo sin metionina o en presencia de CL, un inhibidor de la actividad MAT, da como resultado una disminución en la expresión de PHB1. La recuperación del contenido de AdoMet en el hepatocito evitaba la caída de PHB1.

Los niveles del estado estacionario de PHB1 también disminuían en el hígado de

ratones *ob/ob* y en pacientes obesos, los cuales están predispuestos a desarrollar NASH. NASH es un desorden crónico con una prevalencia en aumento en la población por lo que se está convirtiendo en una de las prioridades de la hepatología clínica. Aunque la patogénesis de NASH se conoce poco, la presente evidencia apoya la existencia de

5 alteraciones mitocondriales que se correlacionan con el estrés oxidativo como uno de los factores importantes. La disminución en la expresión de PHB1 y COX inducida por una deficiencia crónica en AdoMet puede proporcionar un nuevo mecanismo molecular implicado en la patogénesis de NASH. Los resultados obtenidos con ratones *MAT1A*^{-/-} indican que los niveles de PHB1 y COX caían bastante tiempo antes de que se manifestara

10 ningún síntoma histológico de la enfermedad y, por tanto, pueden ser útiles en el diagnóstico precoz y en el tratamiento de NASH.

En resumen, los resultados obtenidos proporcionan un nuevo mecanismo mediante el cual una deficiencia en AdoMet afecta adversamente a la función mitocondrial y genera un estrés oxidativo en el hígado. La caída en los niveles de PHB1 bajo una deficiencia

15 crónica en AdoMet que conduce a un fallo mitocondrial y a un metabolismo anormal de lípidos, hidratos de carbono y aminoácidos puede explicar, al menos en parte, la patogénesis de NASH.

REIVINDICACIONES

1. Un método *in vitro* para diagnosticar NASH, o para evaluar la predisposición de un sujeto a desarrollar NASH, que comprende:

5

a) recoger una muestra de tejido hepático de un sujeto;

10

b) detectar y cuantificar en dicha muestra de tejido hepático el nivel de una proteína seleccionada entre apolipoproteína A1 (APA1), subunidad β de la ATPasa mitocondrial (ATPB), leucotrieno A4 hidrolasa (LKHA), keratina 18 (K1CR), guanidina acetato N-metiltransferasa (GAMT), superóxido dismutasa (SODC), albúmina (ALBU), proteína antioxidante 2 (AOP2) (isoformas 1 y 2), prohibitina 1 (PHB1), metionina adenosil transferasa (MAT), acil CoA deshidrogenasa de cadena larga (ACDL), proteína de unión al selenio (SBP), y combinaciones de las mismas; y

15

c) comparar los resultados obtenidos en la etapa b) con los valores normales, de referencia, para dichas proteínas en tejido hepático.

20

2. Método según la reivindicación 1, en el que dicho sujeto es un ser humano.

3. Método según la reivindicación 1, en el que la detección y cuantificación de dicha proteína seleccionada entre APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU, AOP2 (isoforma 1), AOP2 (isoforma 2), PHB1, MAT, ACDL y/o SBP se realiza mediante el
25 empleo de anticuerpos específicos frente a dichas proteínas.

30

4. Método según la reivindicación 3, en el que dichos anticuerpos comprenden anticuerpos monoclonales, policlonales, fragmentos recombinantes de anticuerpos, combibodies y fragmentos Fab o scFv de anticuerpos específicos frente a dichas proteínas.

5. Método según la reivindicación 1, en el que la detección y cuantificación de dicha proteína seleccionada entre APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU, AOP2

(isoforma 1), AOP2 (isoforma 2), PHB1, MAT, ACDL y/o SBP se realiza mediante técnicas de ELISA o Western blot, o mediante el empleo de dispositivos de tipo biochip o microarray de proteínas que incluyan anticuerpos específicos frente a las proteínas a detectar.

5

6. Método según la reivindicación 1, que comprende detectar y cuantificar el nivel de una proteína seleccionada entre APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU, AOP2 (isoforma 1), AOP2 (isoforma 2), PHB1, MAT, ACDL y SBP.

10 7. Método según la reivindicación 1, que comprende detectar y cuantificar el nivel de dos o más proteínas seleccionadas entre APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU, AOP2 (isoforma 1), AOP2 (isoforma 2), PHB1, MAT, ACDL y SBP.

8. Método según la reivindicación 1, en el que cuando la comparación de los
15 resultados obtenidos en la etapa b) con los valores normales, de referencia, indica que:

(i) la concentración de, al menos, una de las proteínas APA1, ATPB, LKHA, K1CR, GAMT, SODC, ALBU o AOP2 (isoforma 1), es superior al límite superior de los valores normales, de referencia, para dichas proteínas en
20 tejido hepático; y/o

(ii) la concentración de, al menos, una de las proteínas PHB1, AOP2 (isoforma 2), MAT, ACDL o SBP es inferior al límite inferior de los valores normales, de referencia, para dichas proteínas en tejido hepático,

25

entonces, dichos resultados son indicativos de la existencia de NASH en el sujeto cuya muestra de tejido hepático ha sido ensayada o bien de la existencia de una predisposición de dicho sujeto a desarrollar NASH en un futuro.

30 9. Método según la reivindicación 1, en el que dicha proteína a detectar y cuantificar se selecciona entre APA1, ATPB, LKHA, K1CR, PHB1 y sus combinaciones.

10. Método según la reivindicación 9, que comprende detectar y cuantificar el nivel de una proteína seleccionada entre APA1, ATPB, LKHA, keratina 18 y PHB1.
11. Método según la reivindicación 9, que comprende detectar y cuantificar los niveles de, al menos, dos proteínas seleccionadas entre APA1, ATPB, LKHA, K1CR y PHB1.
12. Método según la reivindicación 9, que comprende detectar y cuantificar los niveles de tres o cuatro proteínas seleccionadas entre APA1, ATPB, LKHA, K1CR y PHB1.
13. Método según la reivindicación 9, que comprende detectar y cuantificar los niveles de las proteínas APA1, ATPB, LKHA, K1CR y PHB1.
14. Empleo de una proteína seleccionada entre apolipoproteína A1 (APA1), subunidad β de la ATPasa mitocondrial (ATPB), leucotrieno A4 hidrolasa (LKHA), keratina 18 (K1CR), guanidina acetato N-metiltransferasa (GAMT), superóxido dismutasa (SODC), albúmina (ALBU), proteína antioxidante 2 (AOP2) (isoformas 1 y 2), prohibitina 1 (PHB1), metionina adenosil transferasa (MAT), acil CoA deshidrogenasa de cadena larga (ACDL), proteína de unión al selenio (SBP), y combinaciones de las mismas, en un método *in vitro* para diagnosticar NASH, o para evaluar la predisposición de un sujeto a desarrollar NASH.

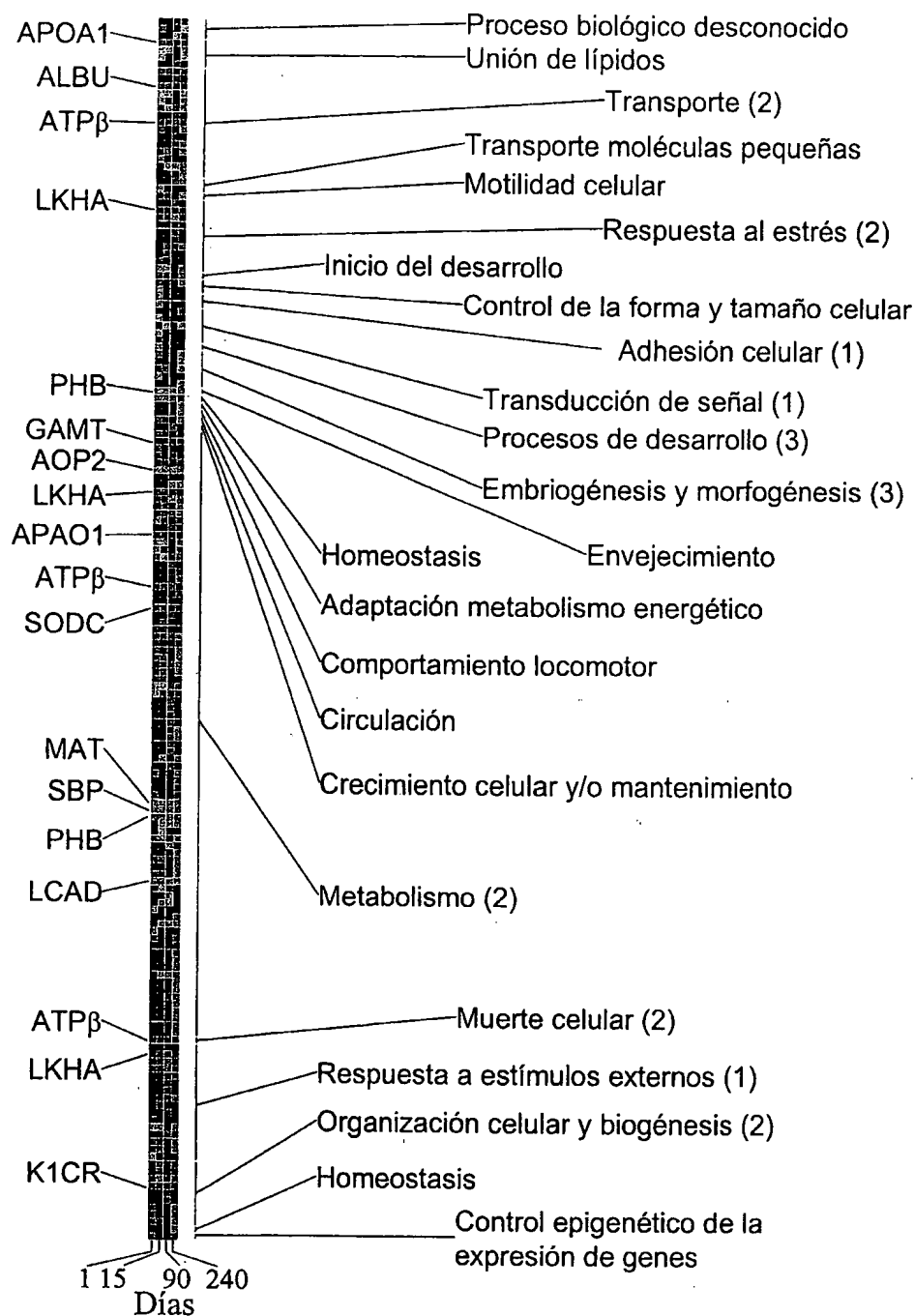


FIGURA 1

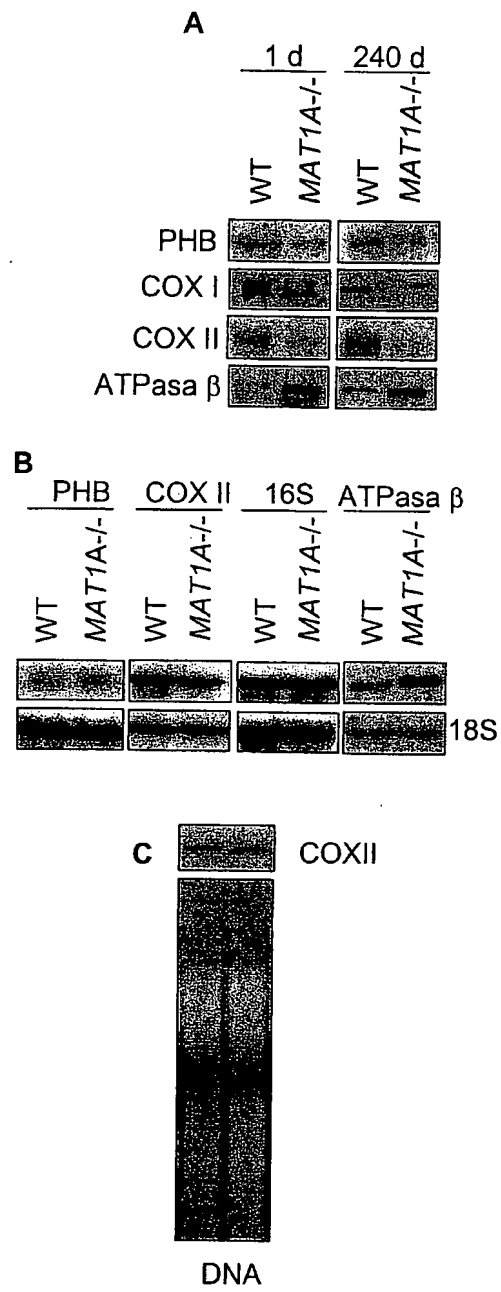


FIGURA 3

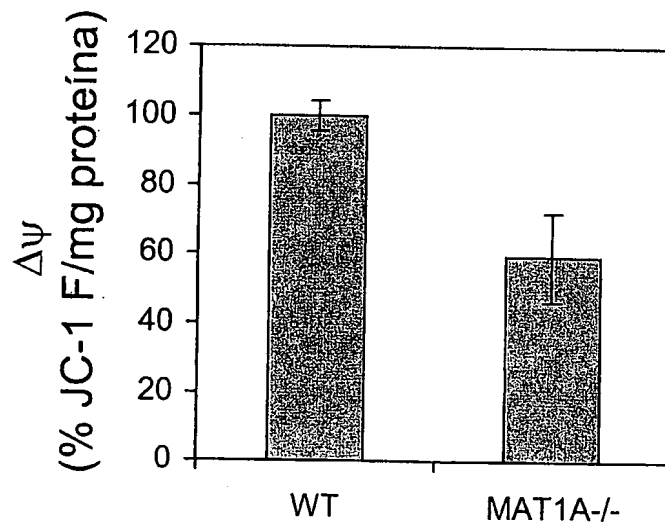


FIGURA 4

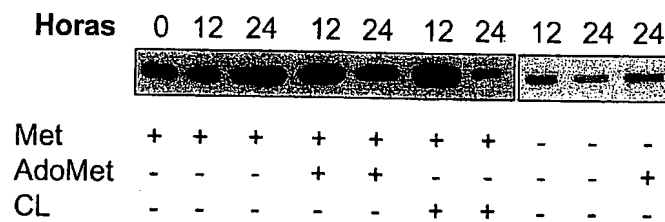


FIGURA 5

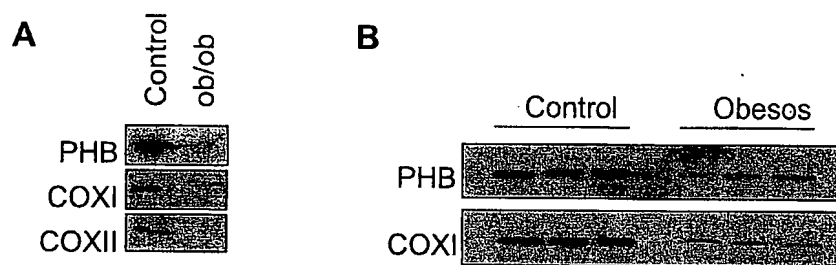


FIGURA 6